

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Oktober 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/087902 A2(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/10,
15/82, C12P 7/64, A01H 5/00Bishopston, Bristol BS7 8EN (GB). **FRASER, Thomas** [GB/GB]; 19 Pyecroft Ave, Henleaze, Bristol BS9 4NL (GB). **LAZARUS, Colin, M.** [GB/GB]; 119 York Road, Montpelier, Bristol BS6 5QG (GB). **QI, Baoxiu** [GB/GB]; 4 Cumberland House, Norfolk Crescent, Bath BAI 2BG (GB). **ABBADI, Amine** [DE/DE]; Lübbersmeyer Weg 26, 22549 Hamburg (DE). **HEINZ, Ernst** [DE/DE]; Puttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/003224

(74) Anwalt: **PRESSLER, Uwe**; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).(22) Internationales Anmeldedatum:
26. März 2004 (26.03.2004)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 14 759.4 31. März 2003 (31.03.2003) DE
103 48 996.7 17. Oktober 2003 (17.10.2003) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **UNIVERSITY OF BRISTOL** [GB/GB]; Senate House, 3rd Floor, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **RENZ, Andreas** [DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str. 6, 67117 Limburgerhof (DE). **BAUER, Jörg** [DE/DE]; Friedrich-Profit-Str. 56, 67063 Ludwigshafen (DE). **FRENTZEN, Margit** [DE/DE]; Worringerweg 1, 52072 Aachen (DE). **SÖZER, Nursen** [DE/DE]; Klosterstr. 38a, 52531 Übach-Palenberg (DE). **KEITH, Stobart** [GB/GB]; 6 Julius Road,

(54) Title: NOVEL PLANT ACYLTRANSFERASES SPECIFIC FOR LONG-CHAINED, MULTIPLY UNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung: NEUE PFLANZLICHE ACYLTRANSFERASEN SPEZIFISCH FÜR LANGKETTIGE MEHRFACH UNGESÄTTIGTE FETTSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of long-chained, multiply unsaturated fatty acids in an organism, wherein nucleic acids coding for polypeptide with acyltransferase activity are introduced into the organism. Said nucleic acid sequences can be advantageously expressed in the organism, optionally together with other nucleic acid sequences coding for polypeptides of the biosynthesis of the fatty acid or lipid metabolism. The invention also relates to a method for the production of oils and/or triacylglycerides with an increased content of long-chained, multiply unsaturated fatty acids. The invention further relates to the nucleic acid sequences, nucleic acids constructs vectors and organisms containing the inventive nucleic acid sequences, vectors containing the nucleic acid sequences and/or nucleic acid constructs and transgenic organisms containing the above-mentioned nucleic acid sequences, nucleic acid constructs and/or vectors. The invention additionally relates to oils, lipids and/or fatty acids produced according to the inventive method and to the utilization thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit Acyltransferaseaktivität codieren. Vorteilhaft können diese Nukleinsäuresequenzen gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fettsäureoder Lipidstoffwechsels codieren, in dem Organismus exprimiert werden. Weiter hin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren. Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung.

WO 2004/087902 A2

Best Available Version



EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Neue pflanzliche Acyltransferasen spezifisch für langketige mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von langketigen

5 mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit Acyltransferaseaktivität codieren. Vorteilhaft können diese Nukleinsäuresequenzen gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fett-
10 säure- oder Lipidstoffwechsels codieren, in dem Organismus exprimiert werden. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langketigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-

15 sequenzen, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren.

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung.

20 Fettsäuren und Triacylglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren oder um Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet. Mehrfach ungesättigte ω -3-Fettsäuren und ω -6-Fettsäuren stellen dabei einen wichtigen Bestandteil der tierischen und menschlichen Nahrung dar. Aufgrund der heute üblichen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist ein Zusatz von mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren, die bevorzugt in Fischölen vorkommen, zur Nahrung besonders wichtig. So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure (= DHA, C22:6^{44,7,10,13,16,19}) oder Eisosapentaensäure (= EPA, C20:5^{45,8,11,14,17}) Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Der ungesättigten Fettsäure DHA wird dabei ein positiver Effekt auf die Entwicklung des Gehirns zugeschrieben.

Im folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFA, LCPUFA oder LCPUFAs bezeichnet (poly unsaturated fatty acids, PUFA, mehrfach ungesättigte

35 Fettsäuren; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, langketige mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder Schizochytrium oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Algen wie Cryptecodium oder Phaeodactylum und weiteren

gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = Triglycerole) anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie z.B. Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt.

5 Höhere mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA, Arachidonsäure (= ARA, C20:4^{Δ5,8,11,14}), Dihomo-γ-linolensäure (C20:3^{Δ8,11,14}) oder Docosapentaensäure (DPA, C22:5^{Δ7,10,13,16,19}) lassen sich nicht aus Ölfruchtpflanzen wie Raps, Soja, Sonnenblume, Färberdistel oder anderen isolieren. Übliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische wie Hering, Lachs, Sardine, Goldbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Thunfisch oder Algen.

10 Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten ω-3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit der Prävention einer Herzerkrankung zugeschrieben. Durch

15 Zugabe dieser ω-3-Fettsäuren zu Nahrung kann das Risiko einer Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert werden. Auch entzündliche speziell chronisch entzündliche Prozesse im Rahmen immunologischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis lassen sich durch ω-3-Fettsäuren positiv beeinflussen. Sie werden deshalb Lebensmitteln speziell diätischen Lebensmitteln

20 zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung. ω-6-Fettsäuren wie Arachidonsäure haben bei diesen rheumatischen Erkrankungen aufgrund unserer üblichen Nahrungsmittelzusammensetzung eher einen negativen Effekt auf diese Krankheiten.

ω-3- und ω-6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, den sogenannten Eicosanoiden wie den Prostaglandinen, die sich von der Dihomo-γ-linolensäure, der 25 Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten, den Thromoxanen und Leukotrienen, die sich von der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten. Eicosanoide (sog. PG₂-Serie), die aus ω-6-Fettsäuren gebildet werden fördern in der Regel Entzündungsreaktionen, während Eicosanoide (sog. PG₃-Serie) aus ω-3-Fettsäuren geringe oder keine entzündungsfördernde Wirkung haben.

30 Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ-9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine

35 Δ-15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine Δ-12-Desaturase beansprucht. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144–20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200–203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649–659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und zu charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141–12147, Wang et al., Plant

Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organismus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US 5,614,393,

5 WO 96/21022, WO 00/21557 und WO 99/27111 beschrieben und auch die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen beschrieben wie in WO 98/46763, WO 98/46764, WO 98/46765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desaturasen wie in WO 99/64616 oder WO 98/46776 und Bildung polyungesättigter Fettsäuren beschrieben und beansprucht. Bzgl. der Effektivität der Expression von Desaturasen und ihren Einfluss auf die Bildung polyungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, dass durch Expression einer einzelnen Desaturase wie bisher beschrieben lediglich geringe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z.B. γ -Linolensäure und Stearidonsäure erreicht wurden. Weiterhin wurde in der Regel ein Gemisch aus ω -3- und ω -6-Fettsäuren erhalten.

10 15 Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen wie Mikroalgen wie Phaeodactylum tricornutum, Porporidium-Arten, Thraustochytrien-Arten, Schizochytrien-Arten oder Cryptecodinium-Arten, Ciliaten, wie Stylonychia oder Colpidium, Pilze, wie Mortierella, Entomophthora oder Mucor und/oder Moosen wie Physcomitrella, Ceratodon und Marchantia (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) Botanica Marina 41: 553-558; K. Totani & K. Oba (1987) Lipids 22: 1060-20 1062; M. Akimoto et al. (1998) Appl. Biochemistry and Biotechnology 73: 269-278).. Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Mutation und Selektion von Stämmen mit 20 25 verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls wie den mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Deshalb werden, wenn immer möglich wie oben beschrieben gentechnologische Verfahren bevorzugt. Mit Hilfe der vorgenannten Mikroorganismen lassen sich jedoch nur begrenzte Mengen der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DPA, EPA oder ARA herstellen. Wobei diese in der Regel je nach verwendeten Mikroorganismus als Fettsäuregemische aus beispielsweise EPA, DPA und DHA anfallen.

30

Die Biosynthese von LCPUFAs und der Einbau von LCPUFAs in Membranen oder Triacylglyceride erfolgt über verschiedene Stoffwechselwege (A. Abbadi et al. (2001) European Journal of Lipid Science & Technology 103:106-113). In Bakterien wie Vibrio und Mikroalgen wie Schizochytrium wird Malonyl-CoA über eine LCPUFA-produzierende Polyketidsynthase zu LCPUFAs umgesetzt (J.G. Metz et al. (2001) Science 293: 290-293; WO 00/42195; WO 98/27203; WO 98/55625). In Mikroalgen wie Phaeodactylum und Moosen wie Physcomitrella werden ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure oder Linolensäure in Form ihrer Acyl-CoAs in mehreren Desaturierungs- und Elongationsschritten zu LCPUFAs umgesetzt (T.K. Zank et al. (2000) Biochemical Society Transactions 28: 654-658). Bei Säugetieren beinhaltet die Biosynthese von DHA zusätzlich zu Desaturierungs- und Elongationsschritten eine Kettenverkürzung über beta-Oxidation.

LCPUFAs liegen in Mikroorganismen und niederen Pflanzen entweder ausschließlich in Form von Membranlipiden vor, wie bei *Physcomitrella* und *Phaeodactylum*, oder sie sind in Membranlipiden und Triacylglyceriden vorhanden, wie bei *Schizochytrium* und *Mortierella*. Der Einbau von LCPUFAs in Lipide und Öle wird durch verschiedene Acyltransferasen und Transacylasen katalysiert. Diese Enzyme sind bereits bekannt für den Einbau von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren [A.R. Slabas (2001) *J. Plant Physiology* 158: 505-513; M. Frentzen (1998) *Fett/Lipid* 100: 161-166]; S. Cases et al. (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 13018-13023]. Bei den Acyltransferasen handelt sich um Enzyme des sogenannten Kennedy-Pathways, die an der cytoplasmatischen Seite des Membransystems des Endoplasmatischen Reticulums, nachfolgend als ‚ER‘ bezeichnet, lokalisiert sind. Experimentell können Membranen des ER als sogenannte ‚mikrosomale Fraktionen‘ aus verschiedenen Organismen isoliert werden [D.S. Knutzon et al. (1995) *Plant Physiology* 109: 999-1006; S. Mishra & Y Kamisaka (2001) *Biochemistry* 355: 315-322; US 5968791]. Diese ER-gebundenen Acyltransferasen in der mikrosomalen Fraktion verwenden Acyl-CoA als aktivierte Form der Fettsäuren. Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, im folgenden GPAT genannt, katalysiert den Einbau von Acylgruppen an der sn-1 Position von Glycerin-3-phosphat. 1-Acylglycerin-3-phosphat Acyltransferase (E.C. 2.3.1.51), auch Lysophosphatidsäure Acyltransferase, im folgenden LPAAT genannt, katalysiert den Einbau von Acylgruppen an der sn-2 Position von Lysophosphatidsäure, nachfolgend als LPA abgekürzt. Nach Dephosphorylierung von Phosphatidsäure durch Phosphatidsäure Phosphatase katalysiert Diacylglycerin Acyltransferase, im folgenden DAGAT genannt, den Einbau von Acylgruppen an der sn-3 Position von Diacylglycerins. Neben diesen Kennedy Pathway Enzymen sind weitere Enzyme am Einbau von Fettsäuren in Triacylglyceride beteiligt, die Acylgruppen aus Membranlipiden in Triacylglyceride einbauen können. Phospholipid Diacylglycerin Acyltransferase, nachfolgend PDAT genannt und Lysophosphatidylcholin Acyltransferase, nachfolgend LPCAT genannt. Auch andere Enzyme wie Lecithin Cholesterin Acyltransferase (LCAT) können am Transfer von Acylgruppen aus Membranlipiden in Triacylglyceride beteiligt sein.

In WO 98/54302 wird von Tjoelker et al. eine humane Lysophosphatidsäure Acyltransferase offenbart sowie ihre mögliche Verwendung zur Therapie von Krankheiten, als diagnostisches Agens sowie eine Methode zur Identifizierung von Modulatoren der humanen LPAAT. Von Leung et al. werden in WO 98/54303 Säuger Lysophosphatidsäure Acyltransferasen beschrieben. Weiterhin offenbaren Leung et al. ein Verfahren zum Screening von pharmazeutischen Verbindungen für die Anwendung beispielsweise bei der Behandlung von Entzündungen.

Weiterhin sind in der Literatur und Patenten eine Vielzahl von Acyltransferasen mit den verschiedensten enzymatischen Funktionen beschrieben worden, so werden z.B. in WO 98/55632 und WO 93/10241 Fettsäure-Alkohol-Acyltransferasen beschrieben, die an der Wachssynthese beteiligt sind. In WO 98/55631 wird eine DAGAT (Diacylglycerin Acyltransferase) aus *Mortierella ramanniana* beschrieben sowie eine aus Jojoba stammende Wachssynthase, die auch DAGAT-Aktivität hat. Slabas et al. (WO 94/13814) offenbart eine membrangebundene sn2-spezifische Acyltransferase,

die eine andere Selektivität beim Einbau von einfach ungesättigter Erukasäure für die sn2-Position hat und so in Raps eine erhöhte Ausbeute an Erukasäure ermöglicht. In WO 96/24674 wird ein entsprechendes Enzym bzw. Gen aus *Limnanthes douglasii* beschrieben. Davies et al. beschreiben in WO 95/27791 LPAATs, die spezifisch für 5 mittellange Fettsäuren sind und diese in die sn2-Position von Triglyceriden einbauen. Weitere neue pflanzliche Acyltransferasessequenzen, die über Homologievergleiche mit Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken gefunden wurden, werden von Lassner et al. (WO 00/18889) beschrieben. Angaben über die spezifische Funktion dieser Acyltransferasessequenzen oder biochemische Daten zu den entsprechenden Enzymen sind 10 WO 00/18889 nicht zu entnehmen.

Die enzymatische Aktivität einer LPCAT wurde erstmals in Ratten beschrieben [Land (1960) *Journal of Biological Chemistry* 235: 2233-2237]. In Pflanzen existiert eine plastidäre Isoform der LPCAT [Akermoun et al. (2000) *Biochemical Society Transactions* 28: 713-715] sowie eine ER gebundene Isoform [Tumaney und Rajasekharan 15 (1999) *Biochimica et Biophysica Acta* 1439: 47-56; Fraser und Stobart, *Biochemical Society Transactions* (2000) 28: 715-7718]. LPCAT ist in Tieren wie auch in Pflanzen an der Biosynthese und der Transacylierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren beteiligt [Stymne und Stobart (1984) *Biochem. J.* 223: 305-314; Stymne und Stobart (1987) in 'The Biochemistry of Plants: a Comprehensive Treatise', Vol. 9 (Stumpf, P.K. 20 ed.) pp. 175-214, Academic Press, New York]. Eine wichtige Funktion der LPCAT oder allgemeiner gesagt einer Acyl-CoA:Lysophospholipid Acyltransferase, nachfolgend LPLAT genannt, bei der ATP-unabhängigen Synthese von Acyl-CoA aus Phospholipiden wurde von Yamashita et al. (2001; *Journal of Biological Chemistry* 276: 26745-26752) beschrieben.

25 Trotz vieler biochemischer Daten konnten bisher keine Gene kodierend für LPCAT identifiziert werden. Gene anderer verschiedener pflanzlicher Acyltransferasen konnten isoliert werden und werden in WO 00/18889 (Novel Plant Acyltransferases) beschrieben.

Höhere Pflanzen enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (C18:2) 30 und Linolensäure (C18:3). ARA, EPA und DHA kommen im Samenöl höherer Pflanzen gar nicht oder nur in Spuren vor (E. Ucciani: *Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Technique & Documentation* – Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Es ist vorteilhaft, in höheren Pflanzen, bevorzugt in Ölsaaten wie Raps, Lein, Sonnenblume und Soja, LCPUFAs herzustellen, da auf diese Weise große Mengen qualitativ hochwertiger LCPUFAs für die Lebensmittelindustrie, die Tierernährung und für pharmazeutische Zwecke kostengünstig gewonnen werden können. Hierzu werden vorteilhaft über gentechnische Methoden Gene kodierend für Enzyme der Biosynthese von LCPUFAs in Ölsaaten eingeführt und exprimiert werden. Dies sind Gene kodierend für Δ-6-Desaturase, Δ-6-Elongase, Δ-5-Desaturase, Δ-5-Elongase und Δ-4-Desaturase. 35 40 Diese Gene können vorteilhaft aus Mikroorganismen und niederen Pflanzen isoliert werden, die LCPUFAs herstellen und in den Membranen oder Triacylglyceriden

einbauen. So konnten bereits Δ -6-Desaturase-Gene aus dem Moos *Physcomitrella patens* und Δ -6-Elongase-Gene aus *P. patens* und dem Nematoden *C. elegans* isoliert.

Transgene Pflanzen, die Gene kodierend für Enzyme der LCPUFA-Biosynthese exprimieren, sind geeignet, geringe Mengen dieser LCPUFAs zu produzieren, allerdings besteht die Gefahr, dass diese nicht in Triacylglyceride, sondern in Membranen eingebaut werden, weil die endogenen Acyltransferasen und Transacylasen LCPUFAs eventuell nicht als Substrat erkennen und folglich nicht in Triacylglyceride einbauen.

10 Dies ist aus folgenden Gründen unerwünscht: (i) der Hauptlipidanteil in Ölsaaten sind Triacylglyceride. Daher ist es aus wirtschaftlicher Sicht notwendig, LCPUFAs in Triacylglyceriden anzureichern. In Membranen eingebaute LCPUFAs können die physikalischen Eigenschaften der Membranen verändern und so schädliche Wirkungen auf die Integrität und Transporteigenschaften der Membranen sowie die Stresstoleranz von Pflanzen haben.

15 Erste transgene Pflanzen, die Gene kodierend für Enzyme der LCPUFA-Biosynthese enthalten und exprimieren und LCPUFAs produzieren wurden beispielsweise in DE 102 19 203 (Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen) erstmals beschrieben. Diese Pflanzen produzieren allerdings LCPUFAs in Mengen, die für eine Aufarbeitung der in den Pflanzen enthaltenen Öle noch weiter optimiert werden müssen.

20 Um eine Anreicherung der Nahrung und des Futters mit diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren speziell in eukaryontischen Systemen.

25 Es bestand daher die Aufgabe ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus vorteilhaft in einem eukaryontischen Organismus bevorzugt in einer Pflanze zu entwickeln. Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in einem Organismus gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte umfasst:

30 a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 dargestellten Sequenz, die für ein Polypeptid mit einer Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität codiert; oder

35 b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus mit der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Sequenz, die für ein Polypeptid mit einer Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität codiert; oder

c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus mit der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 dargestellten Sequenz, die für ein Polypeptid mit einer Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität codiert; oder

5 d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus mit der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Sequenz, die für ein Polypeptid mit einer Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität codiert; oder

10 e) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lässt, oder

15 f) Einbringen mindestens eines Derivates der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 aufweisen und eine äquivalente Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität, Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität aufweisen, und

20 g) kultivieren und ernten des Organismus.

Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens zwei vorteilhaft drei, vier oder fünf Doppelbindungen. Besonders vorteilhaft enthalten die Fettsäuren vier oder fünf Doppelbindungen. Im Verfahren hergestellte Fettsäuren haben vorteilhaft 18-, 20-, 22- oder 24 C-Atome in der Fettsäurekette, bevorzugt enthalten die Fettsäuren 20, 22 oder 24 Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette. Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren wenig oder gar nicht umgesetzt. Unter wenig ist zu verstehen, das im Vergleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 % der Aktivität, vorteilhaft weniger als 3 %,

besonders vorteilhaft mit weniger als 2 % umgesetzt werden. Diese hergestellten Fettsäuren können als einziges Produkt im Verfahren hergestellt werden oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen

5 handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität, Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität und/oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität codieren.

Die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhaft in

10 Membranlipiden und/oder Triacylglyceriden gebunden, können aber auch als freie Fettsäuren oder aber gebunden in Form anderer Fettsäureester in den Organismen vorkommen. Dabei können sie wie gesagt als "Reinprodukte" oder aber vorteilhaft in Form von Mischungen verschiedener Fettsäuren oder Mischungen unterschiedlicher Glyceride vorliegen. Dabei lassen sich die in den Triacylglyceriden gebundenen

15 verschiedenen Fettsäuren von kurzkettigen Fettsäuren mit 4 bis 6 C-Atomen, mittelkettigen Fettsäuren mit 8 bis 12 C-Atomen oder langkettigen Fettsäuren mit 14 bis 24 C-Atomen ableiten, bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren besonders bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren LCPUFAs von C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- und/oder C₂₄-Fettsäuren.

20 Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- und/oder C₂₄-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt. Bevorzugt enthalten diese Fettsäuremoleküle drei, vier oder fünf Doppelbindungen und führen vorteilhaft zur Synthese von Hexadecadiensäure (C16:2^{Δ9,12}), γ-Linolensäure (= GLA, C18:3^{Δ6,9,12}), Stearidonsäure (= SDA, C18:4^{Δ6,9,12,15}), Dihomo-γ-Linolensäure (= DGLA, 20:3^{Δ8,11,14}), Eicosatetraensäure (= ETA, C20:4^{Δ5,8,11,14}), Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder deren Mischungen, bevorzugt EPA und/oder ARA.

Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀-, C₂₂-, und/oder C₂₄-Fettsäuremolekülen können aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide wie Glycosphingolipid, Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerol, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester wie die AcetylCoenzymA-Ester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei bevorzugt drei Doppelbindungen enthalten, isoliert werden, vorteilhaft werden sie in der Form ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form des Phosphatidylcholin isoliert, besonders bevorzugt in der Form der Triacylglyceride. Neben diesen Estern sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch als freie Fettsäuren oder gebunden in anderen Verbindungen in den Organismen vorteilhaft den Pflanzen enthalten. In der Regel liegen die verschiedenen vorgenannten Verbindungen (Fettsäure-

ester und frei Fettsäuren) in den Organismen in einer ungefähren Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% Triglyceride, 2 bis 5 Gew.-% Diglyceride, 5 bis 10 Gew.-% Monoglyceride, 1 bis 5 Gew.-% freie Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% Phospholipide vor, wobei sich die Summe der verschiedenen Verbindungen zu 100 Gew.-% ergänzt.

5 Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die hergestellten LCPUFAs mit einem Gehalt von mindestens 3 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 5 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 8 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 15 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fettsäuren in der transgenen Organismen vorteilhaft in einer transgenen Pflanze hergestellt. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in gebundener Form hergestellt. Mit Hilfe der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren lassen sich diese ungesättigten Fettsäuren an sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhaft hergestellten Triglyceride bringen. Da im erfindungsgemäßen Verfahren von den Ausgangsverbindungen Hexadecadiensäure (C16:2), Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) mehrere Reaktionsschritte durchlaufen werden, fallen die Endprodukte des Verfahrens wie beispielsweise Arachidonsäure (ARA) oder Eicosapentaensäure (EPA) nicht als absolute Reinprodukte an, es sind immer auch geringe Spuren der Vorstufen im Endprodukt enthalten. Sind in dem Ausgangsorganismus bzw. in der Ausgangspflanze beispielsweise sowohl Linolsäure als auch Linolensäure vorhanden, so liegen die Endprodukte wie ARA und EPA als Mischungen vor. Die Vorstufen sollten vorteilhaft nicht mehr als 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht als 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-% bezogen auf die Menge des jeweilige Endprodukts betragen. Vorteilhaft werden in einer transgenen Pflanze als Endprodukte nur ARA oder nur EPA im erfindungsgemäßen Verfahren gebunden oder als freie Säuren hergestellt. Werden beide Verbindungen (ARA + EPA) gleichzeitig hergestellt, werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindesten 1:2 (EPA:ARA), vorteilhaft von mindestens 1:3, bevorzugt von 1:4, besonders bevorzugt von 1:5 hergestellt.

30 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von mindestens 50 %, vorteilhaft von mindestens 80 %, besonders vorteilhaft von mindestens 100 %, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 150 % gegenüber den nicht transgenen Ausgangsorganismus beim Vergleich in der GC-Analyse siehe Beispiele erreicht werden. In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren um mindestens 200 %, bevorzugt um mindestens 250 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 300 % gesteigert werden.

40 Auch chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Fettsäuren oder die Fettsäurezusammensetzungen aus dem Organismus wie den Mikroorganismen oder den Pflanzen oder dem Kulturmedium, in dem oder auf dem die Organismen angezogen wurden, oder aus dem Organismus und dem Kulturmedium in bekannter Weise beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation,

Chromatographie oder Kombinationen dieser Methoden isoliert. Diese chemisch reinen Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich der Lebensmittelindustrie, der Kosmetikindustrie und besonders der Pharmaindustrie vorteilhaft.

- 5 Als Organismus für die Herstellung im erfindungsgemäßen Verfahren kommen prinzipiell alle Organismen wie Mikroorganismen, nicht-humane Tiere oder Pflanzen in Frage. Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Organismen wie Pilze wie *Mortierella* oder *Traustochytrium*, Hefen wie *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, Moose wie *Physcomitrella* oder *Ceratodon*, nicht-humane Tiere wie
- 10 *Caenorhabditis*, Algen wie *Cryptothecodium* oder *Phaeodactylum* oder Pflanzen wie zweikeimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen verwendet. Besonders vorteilhaft werden Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet, die zu den Ölproduzierenden Organismen gehören, das heißt die für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie Pilze wie *Mortierella* oder *Traustochytrium*, Algen wie *Cryptothecodium*, *Phaeodactylum* oder Pflanzen, insbesondere Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Mohn, Senf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss oder Walnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen,
- 15 wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind C18:2- und/oder C18:3-Fettsäure reiche Pflanzen wie Sonnenblume, Färberdistel, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz
- 20 besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein oder Hanf.

Für das erfindungsgemäße beschriebene Verfahren ist es vorteilhaft in den Organismus zusätzlich zu den unter Verfahrensschritt (a) bis (f) eingebrachten Nukleinsäuren zusätzlich weitere Nukleinsäuren einzubringen, die für Enzyme des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren.

Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels vorteilhaft in Kombination mit der erfinderischen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase im Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden vorteilhaft werden Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-

Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) in Kombination mit der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase verwendet. Besonders bevorzugt werden

5 Gene ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen, Δ -6-Desaturasen, Δ -8-Desaturasen, Δ -9-Desaturasen, Δ -12-Desaturasen, Δ -5-Elongasen, Δ -6-Elongasen oder Δ -9-Elongasen in Kombination mit den vorgenannten Genen für die Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin

10 Cholesterin Acyltransferase verwendet, wobei einzelne Gene oder mehrere Gene in Kombination verwendet werden können.

Durch die enzymatische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin

15 Cholesterin Acyltransferase-Aktivität codieren, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferaseaktivität, der Δ -4-, Δ -5-, Δ -6-, Δ -8-Desaturase- oder Δ -5-, Δ -6- oder Δ -9-Elongaseaktivität codieren, können unterschiedlichste mehrfach ungesättigte Fettsäuren im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden. Je nach Auswahl der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Organismen wie den vorteilhaften Pflanze lassen sich Mischungen der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA oder ARA in freier oder gebundener Form herstellen. Je nachdem welche Fettsäurezusammensetzung in der Ausgangspflanze vorherrscht (C18:2- oder C18:3-Fettsäuren) entstehen so Fettsäuren, die sich von C18:2-Fettsäuren ableiten, wie GLA, DGLA oder ARA oder, die sich von C18:3-Fettsäuren ableiten, wie SDA, ETA oder EPA. Liegt in der für das Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur Linolsäure (= LA, C18:2 10,12) vor, so können als Produkte des Verfahrens nur GLA, DGLA und ARA entstehen, die als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen

20 können. Ist in der im Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur α -Linolensäure (= ALA, C18:3 10,12,15) beispielsweise wie in Lein, so können als Produkte des Verfahrens nur SDA, ETA und EPA entstehen, die wie oben beschrieben als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Durch Modifikation der Aktivität der an der Synthese beteiligten Enzyme Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin

25 Acyltransferase vorteilhaft in Kombination mit der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase, Δ -5-, Δ -6-Desaturase und/oder Δ -6-Elongase, oder der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase, Δ -5-, Δ -8-Desaturase und/oder Δ -9-Elongase oder in Kombination mit nur den ersten drei Gene Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase,

30 Δ -6-Desaturase und/oder Δ -6-Elongase oder Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase, Δ -8-Desaturase und/oder Δ -9-Elongase der Synthesekette lassen sich gezielt in den vorgenannten Organismen vorteilhaft in den vorgenannten Pflanzen nur einzelne Produkte herstellen. Durch die Aktivität der Δ -6-Desaturase und Δ -6-Elongase entstehen beispielsweise GLA und DGLA bzw. SDA und ETA, je nach Ausgangs-

35

40

pflanze und ungesättigter Fettsäure. Bevorzugt entstehen DGLA bzw. ETA oder deren Mischungen. Wird die Δ -5-Desaturase zusätzlich in die Organismen vorteilhaft in die Pflanze eingebracht, so entstehen zusätzlich ARA oder EPA. Dies gilt auch für Organismen in die vorher die Δ -8-Desaturase und Δ -9-Elongase eingebracht wurde.

5 Vorteilhaft werden nur ARA oder EPA oder deren Mischungen synthetisiert, abhängig von der in im Organismus bzw. in der Pflanze vorliegenden Fettsäure, die als Ausgangssubstanz für die Synthese dient. Da es sich um Biosyntheketten handelt, liegen die jeweiligen Endprodukte nicht als Reinsubstanzen in den Organismen vor. Es sind immer auch geringe Mengen der Vorläuferverbindungen im Endprodukt enthalten.

10 15 Diese geringen Mengen betragen weniger als 20 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 15 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 10 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 5, 4, 3, 2 oder 1 Gew.-% bezogen auf das Endprodukt DGLA, ETA oder deren Mischungen bzw. ARA, EPA oder deren Mischungen.

Zur Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist es vorteilhaft die Menge an Ausgangsprodukt für die Fettsäuresynthese zu steigern, dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure in den Organismus, die für ein Polypeptid mit Δ -12-Desaturase codiert, erreicht werden. Dies ist besonders vorteilhaft in Ölproduzierenden Organismen wie Raps, die einen hohen Ölsäuregehalt aufweisen. Da diese Organismen nur einen geringen Gehalt an Linolsäure aufweisen (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681) ist die Verwendung der genannten Δ -12-Desaturasen zur Herstellung des Ausgangsprodukts Linolsäure vorteilhaft.

15 20 25 Im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren stammen vorteilhaft aus Pflanzen wie Algen wie Isochrysis oder Cryptothecodium, Algen/Diatomeen wie Phaeodactylum, Moose wie Physcomitrella oder Ceratodon oder höheren Pflanzen wie den Primulaceae wie Aleuritia, Calendula officinalis, Osteospermum spinescens oder Osteospermum hyoseroides, Mikroorganismen wie Pilzen wie Aspergillus, Thraustochytrium, Phytophthora, Entomophthora, Mucor oder Mortierella, Bakterien wie Shewanella, Hefen oder Tieren wie Nematoden wie Caenorhabditis, Insekten oder dem Mensch. Vorteilhaft stammen die Nukleinsäuren aus Pilzen, Tieren oder aus Pflanzen wie Algen oder Moosen, bevorzugt aus Nematoden wie Caenorhabditis.

30 35 40 Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen oder deren Derivat oder Homologe, die für Polypeptide codieren, die noch die enzymatische Aktivität der durch Nukleinsäuresequenzen codierten Proteine besitzen. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den für die Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase und/oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase codierenden Nukleinsäuresequenzen in Expressionskonstrukte cloniert und zum Einbringen und zur Expression in Organismen verwendet. Diese Expressionskonstrukte ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle oder eines ganzen Organismus, der die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei die Zelle und/oder der Organismus mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die für die Lysophosphatidsäure 5 Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase und/oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase codiert, einem Genkonstrukt oder einem Vektor wie nachfolgend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nuklein- 10 säuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipidsstoffwechsels codieren, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Feinchemikalie aus der Kultur. Bei 15 der Kultur kann es sich beispielsweise um eine Fermentationskultur beispielsweise im Falle der Kultivierung von Mikroorganismen wie z.B. Mortierella, Saccharomyces oder Traustochytrium oder um eine Treibhaus oder Feldkultur einer Pflanze handeln. Die so hergestellte Zelle oder der so hergestellte Organismus ist vorteilhaft eine Zelle eines Öl-produzierenden Organismus wie einer Ölfruchtpflanze wie beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Safflower, Hanf, Sonnenblumen oder Borretsch.

Unter Anzucht ist beispielsweise die Kultivierung im Falle von Pflanzenzellen, -gewebe 20 oder -organe auf oder in einem Nährmedium oder der ganzen Pflanze auf bzw. in einem Substrat beispielsweise in Hydrokultur, Blumentopferde oder auf einem Acker- boden zu verstehen.

"Transgen" bzw. "Rekombinant" im Sinne der Erfindung bedeutet bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem 25 Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte 30 genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotid- 35 resten kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen genomischen bzw. chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite 40 und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp,

besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit den entsprechenden Lysophosphatidsäure

5 Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- und/oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Genen - wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

10 Unter transgenen Organismus bzw. transgener Pflanze im Sinne der Erfindung ist wie vorgenannt zu verstehen, dass die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch wie genannt, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im

15 Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder das die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt

20 vor. Bevorzugte transgene Organismen sind Pilze wie Mortierella, Moose wie Physcomitrella, Algen wie Cryptocodium oder Pflanzen wie die Ölfruchtpflanzen.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die Expressionskassette oder den Vektor eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene

25 geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakao- bohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung Mortierella, *Thraustochytrium*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia* oder *Shewanella*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Cyanobakterien, Ciliaten, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptocodium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Flachs, Raps, Färbersafflor, Sonnenblume, Calendula, Mortierella oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen neben den vorgenannten transgenen Organismen auch transgene Tiere vorteilhaft nicht-humane Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*.

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

Hierzu gehören Pflanzenzellen und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von

5 Pflanzen in all ihren Erscheinungsformen, wie Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe und Zellkulturen, das von der eigentlichen transgenen Pflanze abgeleitet ist und/oder dazu verwendet werden kann, die transgene Pflanze hervorzu-bringen.

10 Transgene Pflanzen, die die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehr-fach ungesättigten Fettsäuren enthalten, können vorteilhaft direkt vermarktet werden ohne dass, die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen. Unter Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren sind ganze Pflanzen sowie alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile wie Blatt, Stiel, Samen, Wurzel,

15 Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe, Zellkulturen, die sich von der transgenen Pflanze abgeleiten und/oder dazu verwendet werden können, die transgene Pflanze hervorzubringen. Der Samen umfasst dabei alle Samenteile wie die Samenhüllen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder

20 Embryogewebe. Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen können aber auch aus den Organismen vorteilhaft Pflanzen in Form ihrer Öle, Fett, Lipide und/oder freien Fettsäuren isoliert werden. Durch dieses Verfahren hergestellte mehrfach ungesättigten Fettsäuren lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder vom Feld ernten. Dies kann über Pressen oder

25 Extraktion der Pflanzenteile bevorzugt der Pflanzensamen erfolgen. Dabei können die Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren durch sogenanntes kalt schlagen oder kalt pressen ohne Zuführung von Wärme durch Pressen gewonnen werden. Damit sich die Pflanzenteile speziell die Samen leichter aufschließen lassen, werden sie vorher zerkleinert, gedämpft oder geröstet. Die so vorbehandelten Samen können

30 anschließend gepresst werden oder mit Lösungsmittel wie warmen Hexan extrahiert werden. Anschließend wird das Lösungsmittel wieder entfernt. Im Falle von Mikro-organismen werden diese nach Ernte beispielsweise direkt ohne weitere Arbeitsschritte extrahiert oder aber nach Aufschluss über verschiedene dem Fachmann bekannte Methoden extrahiert. Auf diese Weise können mehr als 96 % der im Verfahren her-
gestellten Verbindungen isoliert werden. Anschließend werden die so erhaltenen

35 Produkte weiter bearbeitet, das heißt raffiniert. Dabei werden zunächst beispielsweise die Pflanzenschleime und Trübstoffe entfernt. Die sogenannte Entschleimung kann enzymatisch oder beispielsweise chemisch/physikalisch durch Zugabe von Säure wie Phosphorsäure erfolgen. Anschließend werden die freien Fettsäuren durch Behand-
lung mit einer Base beispielsweise Natronlauge entfernt. Das erhaltene Produkt wird zur Entfernung der im Produkt verbliebenen Lauge mit Wasser gründlich gewaschen und getrocknet. Um die noch im Produkt enthaltenen Farbstoffe zu entfernen werden die Produkte einer Bleichung mit beispielsweise Bleicherde oder Aktivkohle unter-

40

zogen. Zum Schluss wird das Produkt noch beispielsweise mit Wasserdampf noch desodoriert.

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFA s bzw. LCPUFA s C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im

5 Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

10 Eine Ausführungsform der Erfindung sind deshalb Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFA s umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

15 Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

Unter dem Begriff "Öl", "Lipid" oder "Fett" wird ein Fettsäuregemisch verstanden, das ungesättigte, gesättigte, vorzugsweise veresterte Fettsäure(n) enthält. Bevorzugt ist, dass das Öl, Lipid oder Fett einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten freien oder 20 vorteilhaft veresterten Fettsäure(n), insbesondere Linolsäure, γ-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Arachidonsäure, α-Linolensäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure hat. Vorzugsweise ist der Anteil an ungesättigten veresterten Fettsäuren ungefähr 30 %, mehr bevorzugt ist ein Anteil von 50 %, noch mehr bevorzugt ist ein Anteil von 60 %, 70 %, 25 80 % oder mehr. Zur Bestimmung kann z.B. der Anteil an Fettsäure nach Überführung der Fettsäuren in die Methylestern durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. Calendulasäure, Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Ölsäure etc., enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangsorganismus der Anteil der verschiedenen 30 Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.

Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, handelt es sich wie oben beschrieben beispielsweise um Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder sonstige Fettsäureester.

35 Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens zwei Doppelbindungen lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren beispielsweise über eine Alkalibehandlung beispielsweise wäßrige KOH oder NaOH oder saure Hydrolyse vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol oder über eine enzymatische 40 Abspaltung freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und an-

schließender Ansäuerung über z.B. H₂SO₄. Die Freisetzung der Fettsäuren kann auch direkt ohne die vorhergehend beschriebene Aufarbeitung erfolgen.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder auf einem separaten

5 Plasmid liegen oder in das Genom der Wirtszelle integriert sein. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen
10 Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist. Vorteilhaft werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multiparallelen Expression in die Organismen vorteilhaft zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genen in die Pflanzen gebracht.

15

Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFA in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen
20 und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFA in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFA auch in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren, besonders vorteilhaft für das erfindungsgemäße Verfahren und damit zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere Pflanzen, wie Ölfrucht-
25 pflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Hanf, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar.

Als Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität, Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität oder Lecithin

30 Cholesterin Acyltransferase-Aktivität codieren, und/oder den weiteren verwendeten Nukleinsäuren wie den Nukleinsäuren, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[=acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) codieren eignen sich vorteilhaft C₁₆-, C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren. Bevorzugt werden die im Verfahren als Substrate umgesetzten
40 Fettsäuren in Form ihrer Acyl-CoA-Ester umgesetzt.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettiger PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C₁₆- oder C₁₈-Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase zunächst desaturiert und anschließend über eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese 5 Enzymaktivität zu C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren, und nach zwei oder drei Elongationsrunden zu C₂₂- oder C₂₄-Fettsäuren. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen und Elongasen führt vorzugsweise zu C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- und/oder C₂₄-Fettsäuren vorteilhaft mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen, besonders 10 bevorzugt zu C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Molekül. Nachdem eine erste Desaturierung und die Verlängerung stattgefunden hat, können weitere Desaturierungsschritte wie z.B. eine solche in Δ-5-Position erfolgen. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Dihomo-γ-15 linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahesaensäure. Die C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, 20 Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Der bevorzugte Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen, Lipiden oder Fette in den vorteilhaft verwendeten Pflanzen ist beispielsweise im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, dass die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muss, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann. 25

Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismus wie Hefen wie *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, Pilze wie *Mortierella*, *Aspergillus*, *Phytophtora*, *Entomophthora*, *Mucor* oder *Thraustochytrium* Algen wie *Isochrysis*, *Phaeodactylum* oder *Cryptocodonium* verwendet, so werden diese Organismen 30 vorteilhaft fermentativ angezogen.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für eine Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase und/oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase codieren, können im Verfahren die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens um 5 %, bevorzugt mindestens um 10 %, besonders bevorzugt mindestens um 20 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50 % gegenüber dem Wildtyp der Organismen, die die Nukleinsäuren nicht rekombinant enthalten, erhöht werden. 35

40 Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den im Verfahren verwendeten Organismen prinzipiell auf zwei

Arten erhöht werden. Es kann vorteilhaft der Pool an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder der Anteil der über das Verfahren hergestellten veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöht werden. Vorteilhaft wird durch das erfindungsgemäße Verfahren der Pool an veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den transgenen Organismen erhöht.

Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismen verwendet, so werden sie je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle 10 meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 und 100°C, bevorzugt zwischen 10 bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren können nach dem Fachmann bekannten Verfahren wie oben beschrieben aus den Organismen isoliert werden. Beispielsweise über Extraktion, 20 Destillation, Kristallisation, ggf. Salzfällung und/oder Chromatographie. Die Organismen können dazu vorher noch vorteilhaft aufgeschlossen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird, wenn es sich bei den Wirtsorganismen um Mikroorganismen handelt, vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 95°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 85°C, besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 75°C, 25 ganz besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 45°C durchgeführt

Der pH-Wert wird dabei vorteilhaft zwischen pH 4 und 12, bevorzugt zwischen pH 6 und 9, besonders bevorzugt zwischen pH 7 und 8 gehalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden 30 ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der 35 jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen wie oben beschrieben 40 gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder

5 andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und/oder Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinäure und/oder Linolsäure, Alkohole und/oder Polyalkohole wie z.B. Glycerin, Methanol
10 und/oder Ethanol und/oder organische Säuren wie z.B. Essigsäure und/oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak in flüssiger Form oder Gasform oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

20 Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

25 Als Schwefelquelle für die Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

30 Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

35 Die erfindungsgemäß zur Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzten Fertigungsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthenonat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezi-

fischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie

5 Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

10 Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht

15 durch Zugabe von basischen Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder sauren Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv

20 wirkende Stoffe, wie z.B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z.B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat.

25 Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen, insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthaltenden, Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

30 Die Fermentationsbrühe kann anschließend weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie

z.B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Vorteilhaft wird die Biomasse nach Abtrennung aufgearbeitet.

35 Die Fermentationsbrühe kann aber auch ohne Zellabtrennung mit bekannten Methoden, wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fall-

filmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann schließlich zur Gewinnung der darin enthaltenen Fettsäuren aufgearbeitet werden.

Die im Verfahren gewonnenen Fettsäuren eignen sich auch als Ausgangsmaterial für die chemische Synthese von weiteren Wertprodukten. Sie können beispielsweise in

Kombination miteinander oder allein zur Herstellung von Pharmaka, Nahrungsmittel, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität, Glycerin-

5 3-phosphat Acyltransferase-Aktivität, Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität codieren, wobei die durch die Nukleinsäuresequenzen codierten Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen und/oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen spezifisch C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-Fettsäuren mit mindestens einer

10 Doppelbindungen im Fettsäuremolekül umsetzen und vorteilhaft letztlich in Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride einbauen.

Vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 dargestellten Sequenz,

20 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen

25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 oder SEQ ID NO: 21 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 oder SEQ ID NO: 21 aufweisen und eine Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

Weitere vorteilhafte erfindungsgemäßen isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

35 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Sequenz,

b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen

5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 oder SEQ ID NO: 27 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 oder SEQ ID NO: 27 aufweisen und eine Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

10 Zusätzliche vorteilhafte erfindungsgemäß isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 dargestellten Sequenz,

15 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen

c) Derivate der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 oder SEQ ID NO: 33 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 oder SEQ ID NO: 33 aufweisen und eine Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

20 Eine weitere Gruppe vorteilhafter erfindungsgemäßer isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

25 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Sequenz,

b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen

30 c) Derivate der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 aufweisen und eine Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

35 Mit Hilfe dieser erfindungsgemäß isolierten Nukleinsäuren lassen sich in LCPUFA-produzierende Organismen LCPUFAs an allen Positionen beispielsweise eines

Triacylglycerins einbauen, wie die Positionsanalysen der Lipide von LCPUFA-produzierenden Organismen zeigten.

Die vorgenannten erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen lassen sich vorteilhaft mit den folgenden Nukleinsäuresequenzen kombinieren, die für Polypeptide

5 mit Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 oder SEQ ID NO: 45 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 oder SEQ ID NO: 45 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 oder SEQ ID NO: 45 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 oder SEQ ID NO: 46 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 oder SEQ ID NO: 46 aufweisen und eine Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferaseaktivität aufweisen.

20 Vorteilhaft stammen alle die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen aus einem eukaryontischen Organismus.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität, Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität codieren oder für Proteine des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels

25 vorteilhaft für Proteine mit Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase-, Δ-4-Desaturase-, Δ-5-Desaturase-, Δ-6-Desaturase-, Δ-8-Desaturase-, Δ-9-Desaturase-, Δ-12-Desaturase-, Δ-5-Elongase-, Δ-6-Elongase- oder Δ-9-Elongase-Aktivität, werden vorteilhaft allein oder bevorzugt in Kombination in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einem Organismus 30 vorteilhaft einer Pflanze oder einem Mikroorganismus ermöglicht, eingebracht.

Zum Einbringen werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerasegemisches vor. Die Primer werden in Anlehnung an die zu amplifizierende

35 Sequenz gewählt. Zweckmäßigerweise sollten die Primer so gewählt werden, dass das Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann die Analyse nach gelelektrophoretischer Auf trennung hinsichtlich Qualität und Quantität erfolgen. Im Anschluss kann das Amplifikat nach einem

Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifikats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung. Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilze gewährleisten, und die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobakterium-vermittelte Transformation benötigten vir-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promotoren und Terminatoren und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen vir-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer vir-Gene, aber keine T-DNA und ein zweiter T-DNA, jedoch kein vir-Gen trägt. Dadurch sind letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in *E.-coli* als auch in Agrobacterium zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451. Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittenen und erforderlichenfalls gereinigte Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten mit Einsatz von Ligase kloniert. Dabei kann ein bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt einen oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen. Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen funktional verknüpft. Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie die oben beschriebenen Promotoren und Terminatoren. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in Mikroorganismen, insbesondere *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, unter selektiven Bedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen.

Unter der vorteilhaften Verwendung von Klonierungsvektoren können die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erforderlichen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte in Organismen wie Mikroorganismen oder vorteilhaft Pflanzen eingebracht werden und damit bei der Pflanzentransformation verwendet werden, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utili-

zation, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225)). Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erforderlichen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren lassen sich damit zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Organismen vorteilhaft an Pflanzen verwenden, so dass diese bessere und/oder effizientere Produzenten von PUFA's werden.

5 Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsemäßen Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität des Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Proteins oder -Gens sowie von Genkombinationen mit z.B. Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Desaturasen und/oder Elongasen kann erhöht sein, so dass größere Mengen der produzierten Verbindungen de novo hergestellt werden, weil den Organismen diese Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese vor dem Einbringen des/der entsprechenden Gens/Gene fehlte. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Fettsäure- und Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglicht.

10 25 Durch das Einbringen eines Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase-, Lecithin Cholesterin Acyltransferase-, Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase-, Desaturase- und/oder Elongase-Gens oder mehrerer Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase-, Lecithin Cholesterin Acyltransferase-, Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen-, Desaturase- und/oder Elongase-Gene in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Feinchemikalien (z.B. Fettsäuren, polaren und neutralen Lipiden) nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFA's, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Fettsäuren und Lipide sind selbst als Feinchemikalien wünschenswert; durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase-, Lecithin Cholesterin Acyltransferase-, Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase-,

15 20 25 30 35 40

Desaturase- und/oder Elongase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen

5 aus Organismen und vorteilhaft aus Pflanzen zu steigern.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten isolierten Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine oder Teile von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID

10 NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 ist, so dass das Protein oder der Teil davon eine aufweisen und eine äquivalente Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität,

15 Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität beibehält. Vorzugsweise hat das Protein oder der Teil davon, das/der von dem Nukleinsäuremolekül kodiert wird, noch seine wesentliche enzymatische Aktivität und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen oder Lipidkörperchen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport

20 von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen noch hat. Vorteilhaft ist das von den Nukleinsäuremolekülen kodierte Protein zu mindestens etwa 40 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2,

25 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37. Im Sinne der Erfindung ist unter Homologie oder homolog, Identität oder identisch zu verstehen.

30 Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der verwendeten erfindungsgemäßen Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz mit SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID

35 NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 und deren Derivate codierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch mindestens eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % und ganz besonders 40 % aufweisen und

40 damit am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureester wie Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei desaturierte C18-, C20-, C22- oder C24-Kohlenstoffketten im

Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier oder fünf Stellen gemeint sind.

Vorteilhaft im Verfahren verwendbare Nukleinsäuren stammen aus Bakterien Pilzen oder Pflanzen wie Algen oder Moosen wie den Gattungen Shewanella, Physco-

5 mitrella, Thraustochytrium, Fusarium, Phytophthora, Ceratodon, Isochrysis, Aleurita, Muscarioides, Mortierella, Borago, Phaeodactylum, Cryptocodon oder aus Nematoden wie Caenorhabditis, speziell aus den Gattungen und Arten Shewanella hanedai, Physcomitrella patens, Phytophthora infestans, Fusarium gramineum, 10 Cryptocodon cohnii, Ceratodon purpureus, Isochrysis galbana, Aleurita farinosa, Muscarioides viallii, Mortierella alpina, Borago officinalis, Phaeodactylum tricornutum 15 oder besonders vorteilhaft aus Caenorhabditis elegans.

Alternativ können die verwendeten isolierten Nukleotidsequenzen für Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen codieren, die an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID 20 NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

25 Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Organismen wie Mikroorganismen oder Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für die erforderlichen Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyl-

25 transferasen oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen codieren sowie die Nukleinsäuresequenzen, die für die in Kombination verwendeten Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, die Desaturasen und/oder die Elongasen codieren, mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhaftweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression

30 der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure

35 regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette (= Expressionskonstrukt = Genkonstrukt)

40 kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und

der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nuklein-

5 säuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität
gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder
mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor
enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch
10 am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert
werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Lysophosphatid-
säure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyl-
transferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Gene sowie die vorteilhaft ver-
wendeten Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase-, Δ-4-Desaturase-, Δ5-Desa-
turase-, Δ-6-Desaturase- und/oder Δ-8-Desaturase-Gene und/oder die Δ-5-Elongase-,
15 Δ-6-Elongase- und/oder Δ-9-Elongase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in
der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils
eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses Genkonstrukt oder die
Genkonstrukte können zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann
20 das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert
sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft
für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene
zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben
vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und

25 dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie
Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine
Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA
verbessert wird.

30 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die
eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3,
SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID
NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID
NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID
35 NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 oder dessen Derivate definiert sind und
für Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10,
SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21,
SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31,
SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 kodieren. Die genannten Lyso-
40 phosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacyl-
glycerin Acyltransferasen oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen führen dabei
vorteilhaft zu einem Austausch bzw. Einbau der Fettsäuren zwischen dem Mono-,
Di- und/oder Triglyceridpool der Zelle und dem CoA-Fettsäureester-Pool, wobei das

5 Substrat vorteilhaft ein, zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen aufweist und vorteilhaft 18, 20, 22 oder 24 Kohlenstoffatome im Fettsäuremolekül aufweist. Gleiches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lac-, lacI-, lacIq-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-PR- oder λ-PL-Promotor und werden vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte 10 Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21 (1980) 285–294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem 15 Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397–404 (Gatz et al., Tetracyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase 20 oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße 25 USP Promotor aber auch andere Promotoren wie der LeB4-, DC3, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor 30 aus Arobidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233–239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen Ipt-2- oder Ipt-1-Promotor aus Gerste 35 (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

40 Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. beschrieben in WO 99/16890.

Um einen besonders hohen Gehalt an PUFAs vor allem in transgenen Pflanzen zu erzielen, sollten die PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft **samenspezifisch** in Ölsaaten exprimiert werden. Hierzu können **Samen-spezifische Promotoren** verwendet werden, bzw. solche Promotoren die im **Embryo** und/oder im **Endosperm** aktiv sind. **Samen-**
5 **spezifische Promotoren** können prinzipiell sowohl aus **dikotolydonen** als auch aus **monokotolydonen** Pflanzen isoliert werden. Im folgenden sind vorteilhafte bevorzugte Promotoren aufgeführt: **USP** (= **unknown seed protein**) und **Vicilin** (*Vicia faba*) [Bäumlein et al., *Mol. Gen Genet.*, 1991, 225(3)], **Napin** (**Raps**) [US 5,608,152], **Acyl-Carrier Protein** (**Raps**) [US 5,315,001 und WO 92/18634], **Oleosin** (*Arabidopsis thaliana*) [WO 98/45461 und WO 93/20216], **Phaseolin** (*Phaseolus vulgaris*) [US 5,504,200], **Bce4** [WO 91/13980], **Leguminosen B4** (**LegB4-Promotor**) [Bäumlein et al., *Plant J.*, 2,2, 1992], **Lpt2** und **Lpt1** (**Gerste**) [WO 95/15389 u. WO 95/23230], **Samen-spezifische Promotoren** aus **Reis**, **Mais** u. **Weizen** [WO 99/16890], **Amy32b**, **Amy 6-6** und **Aleurain** [US 5,677,474], **Bce4** (**Raps**) [US 5,530,149], **Glycinin** (*Soja*) [EP 571 741], **Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase** (*Soja*) [JP 06/62870], **ADR12-2** (*Soja*) [WO 98/08962], **Isocitratlyase** (**Raps**) [US 5,689,040] oder **α-Amylase** (**Gerste**) [EP 781 849].

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein **Salicylsäure-induzierbarer Promotor** (WO 95/19443), ein **Tetracyclin-induzierbarer Promotor** (Gatz et al. (1992) *Plant J.* 2, 397-404) und ein **Ethanol-induzierbarer Promotor**.

Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die **Lysophosphatidsäure Acyltransferase**, **Glycerin-3-phosphat Acyltransferase**, **Diacylglycerin Acyltransferase** und/oder die **Lecithin Cholesterin Acyltransferase**, die vorteilhafte **Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase**, **Δ-4-Desaturase**, die **Δ-5-Desaturase**, die **Δ-6-Desaturase**, die **Δ-8-Desaturase** und/oder die **Δ-5-Elongase**, die **Δ-6-Elongase** und/oder die **Δ-9-Elongase** codieren, unter der Kontrolle eines eigenen bevorzugt eines unterschiedlichen Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen führen können. Die Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt vorteilhaft in einem Polylinker anschließend gegebenenfalls ein Terminator hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach bevorzugt drei-, vier- oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und so zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu dreimal. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über die geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihren eigenen Terminator. Es ist aber auch

möglich mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und ggf. vor einem Terminator zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette

5 inseriert sein, ohne dass dadurch die Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielweise der USP-, LegB4 oder DC3-Promotor und unterschiedliche Terminatoren verwendet werden. Es ist aber auch möglich nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden. Dies kann jedoch zu unerwünschten Rekombinationseignissen führen.

10 Wie oben beschrieben sollte die Transkription der eingebrachten Gene vorteilhaft durch geeignete Terminatoren am 3'-Ende der eingebrachten Biosynthesegene (hinter dem Stoppcodon) abgebrochen werden. Verwendet werden kann hier z.B. der OCS1 Terminator. Wie auch für die Promotoren, so sollten hier für jedes Gen unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden.

15 Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene

20 können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt

25 aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]–Desaturase(n), Acyl-ACP–Thioesterase(n), Fettsäure–Acyl–Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid–Acyltransferase(n), Fettsäure–Synthase(n), Fettsäure–Hydroxylase(n), Acetyl–Coenzym A–Carboxylase(n), Acyl–Coenzym A–Oxidase(n), Fettsäure–Desaturase(n), Fettsäure–Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol–Lipase(n), Allenoxid–Synthase(n), Hydroperoxid–Lyase(n) oder Fettsäure–Elongase(n) oder deren Kombinationen verwendet. Besonders vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen sind Biosynthesegene des Fettsäure– oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid–Acyltransferase, Δ -4–Desaturase–, Δ -5–Desaturase–, Δ -6–Desaturase–, Δ -8–Desaturase–, Δ -9–Desaturase–, Δ -12–Desaturase–, Δ -5–Elongase–, Δ -6–Elongase– oder Δ -9–Elongase.

30 Dabei können die vorgenannten Nukleinsäuren bzw. Gene in Kombination mit anderen Elongasen und Desaturasen in erfindungsgemäßen Expressionskassetten kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen mithilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

35 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und

dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhaft-
erweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie
Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine
Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA
verbessert wird. Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen
in die Pflanze verwendet werden oder aber in einen Vektoren eingebracht werden.

Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im
Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Lysophosphatidsäure Acyltransferasen,
Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen oder Lecithin
Cholesterin Acyltransferasen codieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, die die ver-
wendeten Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegegenen
des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie den Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltrans-
ferasen, Δ-4-Desaturase, Δ-5-Desaturase, Δ-6-Desaturase, Δ-8-Desaturase, Δ-9-Desa-
turase, Δ-12-Desaturase, Δ-5-Elongase, Δ-6-Elongase und/oder Δ-9-Elongase. Wie
hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere
Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein
"Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätz-
lichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler
Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können.
Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind,
autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung).
Andere Vektoren werden vorteilhaft beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom
einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zu-
dem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktions-
fähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren"
bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinations-
techniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung
können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die
am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen
Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren, die ähnliche Funktionen ausüben,
umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann
bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, TMV, Transposons, IS-Elemente,
Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

Die im Verfahren vorteilhaft verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren
umfassen die die unten beschriebenen Nukleinsäuren oder das oben beschriebene
Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der verwendeten Nukleinsäuren
in einer Wirtszelle eignen, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressions-
vektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis
der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden
Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem rekombinanten
Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz
von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression
der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide

Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in

Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsg.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin.

Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann.

Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen, Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Desaturasen und Elongasen in prokaryotischen oder

eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Dies ist vorteilhaft, da häufig Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheitshalber in Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise können Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase-, Lecithin Cholesterin Acyltransferase-, Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase-, Desaturase- und/oder Elongase-Gene in

bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsg., S. 396-428: Academic

Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F., et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology, 1, 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium,

Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturaseudocohnilembus, Euplates, Engelmanniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie bevorzugt in Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of

Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-

225 (und darin zitierte Literaturstellen)) exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

5 Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), 10 bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

15 Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA- 20 Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

25 Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 or pBdCI, in Streptomyces plJ101, plJ364, plJ702 oder plJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667.

30 Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYeDesaturasec1 (Baldari et al. (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur 35 Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: 40 More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428:

Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23.

Alternativ können die Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen, Lecithin Cholesterin Acyltransferasen, Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Desaturasen und/oder Elongasen in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: Cloning Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens können die Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen, Lecithin Cholesterin Acyltransferasen, Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Desaturasen und/oder Elongasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agrobacterium tumefaciens-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthase bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/

5 RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

Die Pflanzengenexpression muss wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Nutzbare Promotoren sind konstitutive

10 Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in

15 Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden,

20 wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen

25 sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind

30 geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alphaamylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

35 Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba (Baeumlein et al., Mol Gen

40 Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor

aus *Brassica* (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, *Plant Journal*, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der Ipt2- oder Ipt1-
5 Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

10 Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen allein oder in Kombination mit Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Desaturasen und/oder Elongasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über 15 eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

20 Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus *Arabidopsis*, beschrieben in WO 99/46394.

25 Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder 30 Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie *Methods in Molecular Biology*, 1995, Bd. 44, *Agrobacterium protocols*, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

35 Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Mikroorganismen, wie Pilze oder Hefen oder
40

Pflanzenzellen vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfuchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Hanf, Diestel, Erdnuss, Canola, Lein, Soja, Safflor, 5 Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) sowie ausdauernde 10 Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Raps, Canola, Lein, Hanf, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuß).

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand sind wie oben beschrieben isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität, Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität codieren, wobei die 15 durch die Nukleinsäuresequenzen codierten Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen spezifisch C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-Fettsäuren mit mindestens einer Doppelbindung im Fettsäuremolekül umsetzen.

20 Vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 enthaltenden codierenden 30 Sequenz ableiten lassen,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 oder SEQ ID NO: 21 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 oder SEQ ID NO: 21 aufweisen und eine 35 Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

Weitere vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Sequenz,
- 5 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen,
- 10 c) Derivate der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 oder SEQ ID NO: 27 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 oder SEQ ID NO: 27 aufweisen und eine Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

Weitere vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 dargestellten Sequenz,
- 20 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 oder SEQ ID NO: 33 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 oder SEQ ID NO: 33 aufweisen und eine Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

Weitere vorteilhafte isolierte Nukleinsäuresequenzen sind Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Sequenz,
- 30 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf

Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 aufweisen und eine Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

Die oben genannte erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stammen von Organismen, wie Tieren, Ciliaten, Pilzen, Pflanzen wie Algen oder Dinoflagellaten, die PUFAs synthetisieren können.

Der Begriff "Nukleinsäure(molekül)", wie hier verwendet, umfasst in einer vorteilhaften Ausführungsform zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden

10 Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA

15 des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- und/oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasemolekül zum Beispiel weniger als etwa 20 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt flankieren.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,

25 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenz-

30 information isoliert werden. Auch kann mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Diese können als Hybridisierungs- sonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) zur Iso-

35 lierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16,

40 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleo-

tidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz erstellt worden sind).

5 Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St.Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 10 oder SEQ ID NO: 36 gezeigten Sequenzen oder mithilfe der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 15 oder SEQ ID NO: 37 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genetischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse 20 charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem 25 automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Homologe der verwendeten Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3,

30 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 40 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 35 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, 40 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Weiterhin sind isolierte Nukleinsäuremoleküle einer Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SE-

SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisieren, z.B. unter stringenten

5 Bedingungen hybridisiert. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 kodierten Protein.

Homologen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6,

25 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden 30 und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

Homologen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6,

SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34

35 oder SEQ ID NO: 36 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, 40 sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

Die vorgenannten Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität, Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen oder 5 am Transport lipphiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind, werden im erfindungsgemäßen Verfahren zur Modulation der Produktion von PUFAAs in transgenen Organismen vorteilhaft in Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, 10 Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines 15 Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwendet und/oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der PUFAAs oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation 20 des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Fettsäuren beeinflussen kann).

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf 25 die Zusammensetzung der Lipide hat. Da mehrfach ungesättigte Fettsäuren (= PUFAAs) nicht nur einfach in Triacylglycerin sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet 30 werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen 35 Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäurerückgrat mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. 40 ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsg.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an

5 Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend wieder für die weitere Elongationen aus den Phospholipiden in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-Estern auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.

10 Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C₁₈-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C₂₀ und C₂₂ verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe der im Verfahren verwendeten Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen, Lecithin Cholesterin Acyltransferasen, vorteilhaft in Kombination mit Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Desaturasen wie der Δ-4-, Δ-5-, Δ-6- und Δ-8-Desaturasen und/oder der Δ-5-, Δ-6-, Δ-9-Elongase können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure sowie verschiedene andere langkettige PUFA's erhalten, extra-
15 hiert und für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden. Mit den genannten Enzymen können vorzugsweise C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- und/oder C₂₄-Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremole-
20 kül, vorzugsweise zu C₂₀-, C₂₂- und/oder C₂₄-Fettsäuren mit vorteilhaft drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäuremolekül hergestellt werden. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFA's mit höherem Desaturierungsgrad, einschließlich
25 einer weiteren Elongation von C₂₀ zu C₂₂-Fettsäuren, zu Fettsäuren wie γ-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Arachidonsäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Substrate der Lysophosphatidsäure Acyltransferasen, Glycerin-3-phosphat Acyltransferasen, Diacylglycerin Acyltransferasen oder Lecithin Cholesterin Acyltransferasen im erfindungsgemäßen Verfahren sind C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren
30 wie zum Beispiel Linolsäure, γ-Linolensäure, α-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Eicosatetraensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ-Linolensäure und/oder α-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure fallen im erfindungsgemäßen Ver-
35 fahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester beispielsweise in Form ihrer Glyceride an.

Unter dem Begriff "Glycerid" wird ein mit ein, zwei oder drei Carbonsäureresten verestertes Glycerin verstanden (Mono-, Di- oder Triglycerid). Unter "Glycerid" wird auch ein Gemisch an verschiedenen Glyceriden verstanden. Das Glycerid oder das Glyceridgemisch kann weitere Zusätze, z.B. freie Fettsäuren, Antioxidantien, Proteine, Kohlenhydrate, Vitamine und/oder andere Substanzen enthalten.

Unter einem "Glycerid" im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ferner vom Glycerin abgeleitete Derivate verstanden. Dazu zählen neben den oben beschriebenen Fettsäureglyceriden auch Glycerophospholipide und Glyceroglycolipide. Bevorzugt seien hier die Glycerophospholipide wie Lecithin (Phosphatidylcholin), Cardiolipin, 5 Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin und Alkylacylglycerophospholipide beispielhaft genannt.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren 10 Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (s. Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).

Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Beta-oxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und 15 -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engeneering, Hrsg.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browne, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engeneering, Hrsg.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer, 20 & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsg.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

25 Die im Verfahren hergestellten PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höhere Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden, beispielsweise können Katzen Arachidonsäure nicht mehr 30 synthetisieren.

Der Begriff "Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase" im Sinne der Erfindung umfasst Proteine, die an der Biosynthese von Fettsäuren beteiligt sind, sowie ihre Homologen, Derivaten oder Analoga. Unter Phospholipiden im Sinne 35 der Erfindung sind zu verstehen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, und/oder Phosphatidylinositol vorteilhafterweise Phosphatidylcholin. Die Begriffe Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Nukleinsäuresequenz(en) umfassen Nukleinsäuresequenzen, die eine 40 Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase kodieren und bei

denen ein Teil eine kodierende Region und ebenfalls entsprechende 5'- und 3'- untranslatierte Sequenzbereiche sein können. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (Verbindungen der Formel I), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem

5 bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz

10 der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe

15 Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen

20 Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst

25 dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls wieder gegeben in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, 30 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 Proteine mit mindestens 40 %, vorteilhaft etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie (= Identität) zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37. Die Homologie 40 wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)], die im GCG Software-Packet

[Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm BestFit über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 8, Length Weight: 2.

- 5 Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase codieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird.
- 10 Zusätzlich zu den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 gezeigten Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Nukleotidsequenzen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase führen, innerhalb einer Population existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in der Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40

Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Nukleinsäuremoleküle können auf der Grundlage ihrer Homologie zu den hier offenbarten Lysophosphatidsäure

Acylytransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Nukleinsäuren unter Verwendung der Sequenzen oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert

5 werden. Dabei können beispielsweise isolierte Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die mindestens 15 Nukleotide lang sind und unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekülen, die eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 umfassen, hybridisieren. Es können auch Nukleinsäuren mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide verwendet werden. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen 10 Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass 15 Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem 20 Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringenten Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodiumcitrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 25 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 30 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im obengenannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die 35 Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungs- 40 bedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford 45 University Press, Oxford, bestimmt werden können.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37) oder von zwei Nukleinsäuren (z.B. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36) werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure- "Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure- "Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen. Die verwendeten Programme bzw. Algorithmen sind oben beschrieben.

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäure-

substitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Amino-
säureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der
Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausge-
tauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten
5 definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten
(z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutamin-
säure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin,
Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin,
10 Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten
(z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenyl-
alanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in
einer Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase,
15 Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase wird somit vor-
zugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie
ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen
zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der Lysophosphatidsäure Acyltrans-
ferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder
20 Lecithin Cholesterin Acyltransferase kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B.
durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier
beschriebenen Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltrans-
ferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-
25 Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die die Lysophosphatid-
säure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltrans-
ferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität beibehalten haben. Nach der
Mutagenese einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,
SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13,
SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22,
SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32,
30 SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 kann das kodierte Protein rekombinant expri-
miert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier
beschriebenen Tests bestimmt werden.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht,
die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser
35 Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und ver-
öffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispiele

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

a) Allgemeine Klonierungsverfahren:

40 Klonierungsverfahren, wie beispielsweise Restriktionsspaltungen, Agarosegelektro-
phorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitro-
cellulose- und Nylonmembranen, Verbindung von DNA-Fragmenten, Transformation

von *Escherichia coli*- und Hefe-Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA, wurden durchgeführt wie beschrieben in Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) oder Kaiser, Michaelis und Mitchell (1994) "Methods in Yeast Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3).

5

b) Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, in p.A.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden unter 10 Verwendung von reinem pyrogenfreiem Wasser, im nachstehenden Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q-Wassersystem-Wasserreinigungsanlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden bezogen von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) 15 und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Wenn nicht anders angegeben, wurden sie nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

15

c) Klonierung und Expression von Desaturasen und Elongasen

20 Der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue MRF' kan (Stratagene) wurde zur Subklonierung der Δ-6-Desaturase aus *Physcomitrella patens* verwendet. Für die funktionelle Expression dieses Gens wurde der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSc 1 (Invitrogen Co.) verwendet. *E. coli* wurde in Luria-Bertani-Brühe (LB, Duchefa, Haarlem, Niederlande) bei 37°C kultiviert. Wenn nötig, wurde Ampicillin (100 mg/Liter) 25 zugegeben, und 1,5 % Agar (Gew./Vol.) wurde für feste LB-Medien hinzugefügt. *S. cerevisiae* wurde bei 30°C entweder in YPG-Medium oder in komplettem Minimalmedium ohne Uracil (CMdum; siehe in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M., und Varki, A. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)

30 mit entweder 2 % (Gew./Vol.) Raffinose oder Glucose kultiviert. Für feste Medien wurden 2 % (Gew./Vol.) Bacto™-Agar (Difco) hinzugefügt. Die zur Klonierung und Expression verwendeten Plasmide sind pUC18 (Pharmacia) und pYES2 (Invitrogen Co.).

25

d) Klonierung und Expression PUFA-spezifischer Desaturasen und Elongasen

35 Für die Expression in Pflanzen wurden cDNA Klone aus SEQ ID NO: 46 (*Physcomitrella patens* Δ-6-Desaturase), 48 (*Physcomitrella patens* Δ-6-Elongase) oder 50 (*Phaedactylum tricorne* Δ-5-Desaturase) so modifiziert, dass lediglich die Codierregion mittels Polymerase Kettenreaktion unter Zuhilfenahme zweier Oligonukleotide amplifiziert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Konsensussequenz vor dem Startcodon zur effizienten Translation eingehalten wurde. Entweder

40

wurde hierzu die Basenfolge ATA oder AAA gewählt und vor das ATG in die Sequenz eingefügt [Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, *Cell* 44, 283-2929]. Vor diesem Konsensustriplett wurde zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle eingeführt, 5 die kompatibel sein muss zur Schnittstelle des Zielektors, in den das Fragment kloniert werden soll und mit dessen Hilfe die Genexpression in Mikroorganismen oder Pflanzen erfolgen soll.

Die PCR-Reaktion wurde mit Plasmid-DNA als Matrize in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA-(Stratagene)Polymerase und dem folgenden Temperatur- 10 programm durchgeführt: 3 min bei 96°C, gefolgt von 30 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 2 min bei 72°C, 1 Zyklus mit 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C. Die Anlagerungstemperatur wurde je nach gewählten Oligonukleotiden variiert. Pro Kilobasenpaare DNA ist von einer Synthesezeit von etwa einer Minute auszugehen. Weitere Parameter, die Einfluss auf die PCR haben wie z.B. Mg-Ionen, Salz, DNA 15 Polymerase etc., sind dem Fachmann auf dem Gebiet geläufig und können nach Bedarf variiert werden.

Die korrekte Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Gel mit dem QIAquick-Gelextraktionskit (QIAGEN) extrahiert und in die SmaI-Restriktionsstelle des 20 dephosphorylierten Vektors pUC18 unter Verwendung des Sure Clone Ligations Kit (Pharmacia) ligiert, wobei die pUC-Derivate erhalten wurden. Nach der Transformation von *E. coli* XL1 Blue MRF' kan wurde eine DNA-Minipräparation [Riggs, M.G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid, 25 mini-preparation. *BioTechniques* 4, 310-313] an ampicillinresistenten Transformanden durchgeführt, und positive Klone mittels BamHI-Restriktionsanalyse identifiziert. Die Sequenz des klonierten PCR-Produktes wurde mittels Resequenzierung unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) bestätigt.

- e) Transformation von Agrobacterium
- 30 Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation wurde, wenn nicht anders beschrieben, wie von Deblaere et al. (1984, *Nucl. Acids Res.* 13, 4777-4788) mit Hilfe eines Agrobacterium tumefaciens-Stamms durchgeführt.
- f) Pflanzentransformation
- 35 Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation wurde, wenn nicht anders beschrieben, unter Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerations-techniken durchgeführt (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., *Plant Molecular Biology Manual*, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press, 40 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

Nach diesen kann beispielsweise Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyltransformation transformiert werden (Moloney et al., Plant Cell 8 (1989) 238-242; De Block et al., Plant Physiol. 91 (1989) 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten 5 binären Vektor und Agrobacterium-Stamm ab. Die Rapsselektion wird dabei gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, 10 US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuss, Polyethylen-glycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) 15 ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) wurde, wenn nicht anders beschrieben, wie bei Mlynarova et al. [(1994) Plant Cell Report 13:282-285] beschriebenen Technik durchführt.

g) Plasmide für die Pflanzentransformation

20 Zur Pflanzentransformation wurden binäre Vektoren auf Basis der Vektoren pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230) oder pGPTV (Becker et al 1992, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197) verwendet. Die Konstruktion der binären Vektoren, die die zu exprimierenden Nukleinsäuren enthalten, erfolgt durch Ligation der cDNA in Sense-Orientierung in die T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzen- 25 promotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA. Die binären Vektoren können unterschiedliche Markergene tragen wie beispielsweise das Acetolactat Synthasegens (AHAS oder ALS) [Ott et al., J. Mol. Biol. 1996, 263:359-360], das eine Resistenz gegen die Imidazolinone vermittelt oder das nptII-Markergen, das für eine Kanamycin-Resistenz vermittelt durch Neomycinphosphotransferase codiert.

30 Die gewebespezifische Expression der Nukleinsäuren lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Wenn nicht anders beschrieben wurde der LeB4- oder der USP-Promotor oder der Phaseolin-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Als Terminationen wurde der NOS-Terminator und der OCS-Terminator verwendet (siehe Figur 1). Figur 1 zeigt eine Vektorkarte des zur Expression verwendeten Vektor pSUN3CeLPLAT.

Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement wie z.B. der Napin- oder Arcelin Promotor Goossens et al. 1999, Plant Phys. 120(4):1095-1103 und Gerhardt et al. 2000, Biochimica et Biophysica Acta 1490(1-2):87-98 kann verwendet werden.

Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanzen lässt sich der CaMV-35S-Promotor oder ein v-ATPase C1 Promotor verwenden.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen; Desaturasen oder Elongasen codieren, wurden durch Konstruktion

5 mehrerer Expressionskassetten hintereinander in einen binären Vektor kloniert, um den Stoffwechselweg in Pflanzen nachzubilden.

Innerhalb einer Expressionskassette kann das zu exprimierende Protein unter Verwendung eines Signalpeptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden

10 (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Das Signalpeptid wird 5' im Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsprotein zu erreichen.

Beispiele für Multiexpressionskassetten wurden in DE 102 19 203 offenbart und sind im folgenden nochmals wiedergegeben.

15 i.) Promotor-Terminator-Kassetten

Expressionskassetten bestehen aus wenigstens zwei funktionellen Einheiten wie einem Promotor und einem Terminator. Zwischen Promotor und Terminator können weitere gewünschte Gensequenzen wie Targetting-Sequenzen, Codierregionen von Genen oder Teilen davon etc. eingefügt werden. Zum Aufbau der Expressionskassetten wurden Promotoren und Terminatoren (USP Promotor: Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67); OCS Terminator: Gielen et al. EMBO J. 3 (1984) 835ff.) mithilfe der Polymerasekettenreaktion isoliert und mit flankierenden Sequenzen nach Wahl auf Basis von synthetischen Oligonukleotiden maßgeschneidert.

Folgende Oligonukleotide können beispielsweise verwendet werden:

25 USP1 vorne:

- CCGGAATTCGGCGGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTACACATTGCCA -

USP2 vorne:

- CCGGAATTCGGCGGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTACACATTGCCA -

USP3 vorne:

30 - CCGGAATTCGGCGGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTACACATTGCCA -

USP1 hinten:

- AAAACTGCAGGCGGCCACCGCGGTGGCTGGCTATGAAGAAATT -

USP2 hinten:

- CGCGGATCCGCTGGCTATGAAGAAATT -

USP3 hinten:

- TCCCCCGGGATCGATGCCGGCAGATCTGCTGGCTATGAAGAAATT -

OCS1 vorne:

- AAAACTGCAGTCTAGAAGGCCTCCTGCTTAATGAGATAT -

5 OCS2 vorne:

- CGCGGATCCGATATCGGGCCCGCTAGCGTTAACCTGCTTAATGAGATAT -

OCS3 vorne:

- TCCCCCGGGGCCATGGCCTGCTTAATGAGATAT -

OCS1 hinten:

10 - CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCTCGACGGACAATCAGTAAATTGA -

OCS2 hinten:

- CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCTCGACGGACAATCAGTAAATTGA -

OCS3 hinten:

- CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGACGGACAATCAGTAAATTGA -

15 Die Methoden sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und sind allgemein literaturbekannt.

In einem ersten Schritt wurden ein Promotor und ein Terminator über PCR amplifiziert. Dann wurde der Terminator in ein Empfängerplasmid kloniert und in einem zweiten Schritt der Promotor vor den Terminator inseriert. Dadurch wurde eine Expressions-

20 kassette in das Basis-Plasmid cloniert. Auf Basis des Plamides pUC19 wurden so die Plasmide pUT1, 2 und 3 erstellt.

Die entsprechenden Konstrukte bzw. Plasmide sind in SEQ ID NO: 52, 53 und 54 definiert. Sie enthalten den USP-Promotor und den OCS Terminator. Auf Basis dieser Plasmide wurde das Konstrukt pUT12 erstellt, indem pUT1 mittels Sall/Scal ge-

25 schnitten wurde und pUT2 mittels Xhol/Scal geschnitten wurde. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente wurden ligiert und in E. coli XL1 blue MRF transformiert. Es wurde nach Vereinzelung von ampicillinresistenten Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die zwei Expressionskassetten enthalten. Die Xhol/Sall Ligation kompatibler Enden hat dabei die beiden

30 Schnittstellen Xhol und Sall zwischen den Expressionskassetten eliminiert. Das resultierende Plasmid pUT12 wird in SEQ ID NO: 55 wiedergegeben. Anschließend wurde pUT12 wiederum mittels Sal/Scal geschnitten und pUT3 mittels Xhol/Scal geschnitten. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente wurden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wurde wieder nach Vereinzelung aus

35 ampicillinresistenten Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die drei Expressionskassetten enthalten. Auf diese Weise wurde ein Set von Multiexpressionskassetten geschaffen, dass für die Insertion gewünschter

DNA genutzt werden kann und in Tabelle 1 beschrieben wird und zudem noch weitere Expressionskassetten aufnehmen kann.

Diese enthalten folgende Elemente:

Tabelle 1

PUC19-Derivat	Schnittstellen vor dem USP Promotor	Multiple Klonierungs-Schnittstellen	Schnittstellen hinter dem OCS-Terminator
PUT1	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI	Sall/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
PUT2	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	Sall/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
PUT3	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	Sall/SacI/ AscI/HindIII
PUT12 Doppel-expressions-kassette	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI Und BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	Sall/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
PUT123 Tripel-expressions-kassette	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	1. BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und 2. BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI und 3. BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	Sall/SacI/AscI/HindIII

5

Weiterhin lassen sich wie beschrieben und wie in Tabelle 2 näher spezifiziert weitere Multiexpressionskassetten mithilfe des

- i) USP-Promotors oder mithilfe des
- ii) 700 Basenpaare 3'-Fragmentes des LeB4-Promotors oder mithilfe des
- 10 iii) DC3-Promotors erzeugen und für samenspezifische Genexpression einsetzen.

Der DC3-Promotor ist beschrieben bei Thomas, Plant Cell 1996, 263:359-368 und besteht lediglich aus der Region -117 bis +26 weshalb er mithin einer der kleinsten bekannten samenspezifischen Promotoren darstellt. Die Expressionskassetten können mehrfach den selben Promotor enthalten oder aber über drei verschiedene Promotoren aufgebaut werden.

Vorteilhaft verwendete Polylinker- bzw. Polylinker-Terminator-Polylinker sind den Sequenzen SEQ ID NO: 60 bis 62 zu entnehmen.

Tabelle 2: Multiple Expressionskassetten

Plasmidname des pUC19-Derivates	Schnittstellen vor dem jeweiligen Promotor	Multiple Klonierungs-Schnittstellen	Schnittstellen hinter dem OCS-Terminator
pUT1 (pUC19 mit USP-OCS1)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/PstI/ XbaI/StuI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
PDCT (pUC19 mit DC3-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(2) BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
PleBT (pUC19-mit LeB4(700)-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(3) BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII
PUD12 (pUC 19 mit mit USP-OCS1 und mit DC3-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und (2) BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
PUDL123 Triple expression cassette (pUC19 mit USP/DC3 und LeB4-700)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und (2) BamHI/ (EcoRV*)/ApaI/NheI/ HpaI und (3) BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII

* EcoRV Schnittstelle schneidet im 700 Basenpaarfragment des LeB4 Promotors (LeB4-700)

5 Analog lassen sich weitere Promotoren für Multigenkonstrukte erzeugen insbesondere unter Verwendung des

- 2,7 kB Fragmentes des LeB4-Promotors oder mithilfe des
- Phaseolin-Promotors oder mithilfe des
- konstitutiven v-ATPase c1-Promotors.

10 Es kann insbesondere wünschenswert sein, weitere besonders geeignete Promotoren zum Aufbau samenspezifischer Multiexpressionskassetten wie z.B. den Napin-Promotor oder den Arcelin-5 Promotor zu verwenden.

Weitere in Pflanzen nutzbare Vektoren mit einer bzw. zwei oder drei Promotor-Terminator-Expressionkassetten sind den Sequenzen SEQ ID NO: 63 bis

15 SEQ ID NO: 68 zu entnehmen.

- Erstellung von Expressionskonstrukten, die Promotor, Terminator und gewünschte Gensequenz zur PUFA Genexpression in pflanzlichen Expressionskassetten enthalten.

In pUT123 wird zunächst über BstXI und XbaI die Δ -6-Elongase Pp_PSE1 in die erste Kassette inseriert. Dann wird die Δ -6-Desaturase aus Moos (Pp_des6) über BamHI/Nael in die zweite Kassette inseriert und schließlich die Δ -5-Desaturase aus Phaeodactylum (Pt_des5) über BgIII/Ncol in die dritte Kassette inseriert (siehe SEQ ID NO: 56). Das Dreifachkonstrukt erhält den Namen pARA1. Unter Berücksichtigung sequenzspezifischer Restriktionsschnittstellen können weitere Expressionskassetten gemäß Tabelle 3 mit der Bezeichnung pARA2, pARA3 und pARA4 erstellt werden.

Tabelle 3: Kombinationen von Desaturasen und Elongasen

Gen Plasmid	Δ -6-Desaturase	Δ -5-Desaturase	Δ -6-Elongase
pARA1	Pp_des6	Pt_des5	Pp_PSE1
pARA2	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1
pARA3	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
pARA4	Ce_des6	Ce_des5	Ce_PSE1

10 des5 = PUFA spezifische Δ -5-Desaturase
 des6 = PUFA spezifische Δ -6-Desaturase
 PSE = PUFA spezifische Δ -6-Elongase
 Pt_des5 = Δ -5-Desaturase aus Phaeodactylum tricornutum
 15 Pp_des6 oder Pt_des6 = Δ -6-Desaturase aus Physcomitrella patens bzw. Phaeodactylum tricornutum
 Pp = Physcomitrella patens, Pt = Phaeodactylum tricornutum
 Pp_PSE1 = Δ -6-Elongase aus Physcomitrella patens
 Pt_PSE1 = Δ -6-Elongase aus Phaeodactylum tricornutum
 20 Ce_des5 = Δ -5-Desaturase aus Caenorhabditis elegans (Genbank Acc. Nr. AF078796)
 Ce_des6 = Δ -6-Desaturase aus Caenorhabditis elegans (Genbank Acc. Nr. AF031477, Basen 11-1342)
 Ce_PSE1 = Δ -6-Elongase aus Caenorhabditis elegans (Genbank Acc. Nr. AF244356, Basen 1-867)
 25 Auch weitere Desaturasen oder Elongasegensequenzen können in Expressionskassetten beschriebener Art inseriert werden wie z.B. Genbank Acc. Nr. AF231981, NM_013402, AF206662, AF268031, AF226273, AF110510 oder AF110509.
 iii.) Transfer von Expressionskassetten in Vektoren zur Transformation von Agrobakterium tumefaciens und zur Transformation von Pflanzen
 30 Die so erstellten Konstrukte wurden mittels Ascl in den binären Vektor pGPTV inseriert. Die multiple Klonierungssequenz wurde zu diesem Zweck um eine Ascl Schnittstelle erweitert. Zu diesem Zweck wurde der Polylinker als zwei doppelsträngige Oligonukleotide neu synthetisiert, wobei eine zusätzliche Ascl DNA Sequenz eingefügt wird. Das Oligonukleotid wurde mittels EcoRI und HindIII in den Vektor pGPTV inseriert. Die

notwendigen Kloniertechniken sind dem Fachmann bekannt und können einfach wie in Beispiel 1 beschrieben nachgelesen werden.

Für die im folgenden beschriebenen Versuche wurden als Nukleinsäuresequenzen für die Δ -5-Desaturase (SEQ ID NO: 50), die Δ -6-Desaturase (SEQ ID NO: 46) und die

5 Δ -6-Elongase (SEQ ID NO: 48), die Sequenzen aus *Physcomitrella patens* und *Phae-*
dactylum tricormutum verwendet. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen sind
den Sequenzen SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49 und SEQ ID NO: 51 zu entnehmen.
Ein Vektor der alle vorgenannten Gene enthält ist in SEQ ID NO: 56 wiedergegeben.
Die korrespondierenden Aminosäurensequenzen der Gene sind SEQ ID NO: 57,
10 SEQ ID NO: 58 und SEQ ID NO: 59 zu entnehmen.

Beispiel 2: Klonierung und Charakterisierung der ceLPLATs (SEQ ID NO: 38 - 44)

a) Datenbanken-Suche

Die Identifizierung der ceLPLATs (= Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase aus *Caenorhabditis elegans*) erfolgte durch Sequenzvergleiche mit bekannten LPA-ATs.

15 Die Suche wurde mit Hilfe des BLAST-Psi-Algorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410) auf das Nematodengenom (*Caenorhabditis elegans*) beschränkt, da dieser Organismus LCPUFAs synthetisiert. Für den Sequenzvergleich diente als Sonde eine LPAAT Proteinsequenz aus *Mus musculus* (MsLPAAT Accession Nr. NP_061350). LPLAT katalysiert durch eine reversible Transferasereaktion die ATP-
20 unabhängige Synthese von Acyl-CoAs aus Phospholipiden mit Hilfe von CoA als Cofaktor (Yamashita et al., J. Biol. Chem. 2001, 20: 26745-26752). Durch Sequenzvergleiche konnten zwei putative ceLPLAT-Sequenzen identifiziert werden (Accession Nr. T06E8.1 bzw. F59F4.4). Die identifizierten Sequenzen weisen die größte Ähnlichkeit jeweils zueinander und zu MsLPAATs auf (Figur 2). Das Alignment wurde mit dem
25 Programm Clustal erstellt.

b) Klonierung der CeLPLATs

Auf der Basis der ceLPLAT-Nukleinsäuresequenzen wurden Primerpaare synthetisiert (Tabelle 4) und mittels PCR-Verfahren die zugehörigen cDNAs aus einer *C. elegans*-cDNA-Bank isoliert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie

30 die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der LPLAT-cDNAs wurde jeweils mit 2 μ l cDNA-Bank-Lösung als Template, 200 μ M dNTPs, 2,5 U "proof-reading" *pfu*-Polymerase und 50 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 35 58°C für eine Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten. Die Sequenz der LPLAT-cDNAs wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 4: Nukleotidsequenzen der PCR-Primer zur Klonierung von CeLPLATs

Primer	Nukleotidsequenz
5' T06E8.1f*	5' ACATAATGGAGAACCTCTGGTCGATCGTC 3'
3' T06E8.1r*	5' TTACTCAGATTTCTTCCCGTCTT 3'
5' F59F4.4f*	5' ACATAATGACCTTCCTAGCCATATTA 3'
3' F59F4.4r*	5' TCAGATATTCAAATTGGCGGCTTC 3'

* f: forward, r: reverse

Beispiel 3: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

5 a) Aufarbeitungsmöglichkeiten

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pilzen, Algen, Ciliaten oder wie in den Beispielen weiter oben beschrieben in Hefen auf die Produktion der mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder Pflanzen kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den

10 vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion der Lipide oder Fettsäuren untersucht wird.

Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-

15 Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al.

20 (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

25

Neben den oben erwähnten Verfahren zum Nachweis von Fettsäuren in Hefen werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry

152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., *Advances in Lipid Methodology*, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide* - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 5 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* CODEN.

10 So kann die Analyse von Fettsäuren oder Triacylglycerin (= TAG, Abkürzungen in Klammern angegeben) z.B. mittels Fettsäuremethylester (= FAME), Gas-Flüssigkeits-chromatographie-Massenspektrometrie (= GC-MS) oder Dünnschichtchromatographie (TLC) erfolgen.

15 Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: *Advances on Lipid Methodology*, Vierte Aufl.: Christie, 15 Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, *Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren*, Lipide 33:343-353).

20 Das zu analysierende Pflanzenmaterial kann dazu entweder durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material wird dann anschließend nach dem Aufbrechen zentrifugiert. Das Sediment wird danach in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte 25 Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester können anschließend in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen werden. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester lassen sich unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), 30 definieren.

35 Bei Fettsäuren, für die keine Standards verfügbar sind, kann die Identität über Derivatisierung und anschließende GC-MS-Analyse gezeigt werden. Beispielsweise wird die Lokalisierung von Fettsäuren mit Dreifachbindung über GC-MS nach Derivatisierung mit 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998, siehe oben) gezeigt.

b) Fettsäureanalyse in Pflanzen

Die Gesamt-Fettsäuren wurden aus Pflanzensamen extrahiert und mittels Gas-chromatographie analysiert.

Die Samen wurden mit 1 % Natriummethanolat in Methanol aufgenommen und 20 min bei RT (ca. 22 °C) inkubiert. Anschließend wurde mit NaCl Lösung gewaschen und die FAME in 0,3 ml Heptan aufgenommen.

Die Proben wurden auf einer ZEBRON-ZB-Wax-Kapillarsäule (30 m, 0,32 mm, 5 0,25 mikro m; Phenomenex) in einem Hewlett Packard-6850-Gaschromatograph mit einem Flammenionisationsdetektor aufgetrennt. Die Ofentemperatur wurde von 70°C (1 min halten) bis 200°C mit einer Rate von 20°C/min, dann auf 250°C (5 min halten) mit einer Rate von 5°C/min und schließlich auf 260°C mit einer Rate von 5°C/min 10 programmiert. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet (4,5 ml/min bei 70°C). Die Fettsäuren wurden durch Vergleich mit Retentionszeiten von FAME-Standards (SIGMA) identifiziert.

Beispiel 4: Funktionelle Charakterierung der CeLPLATs in Hefe

a) Heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Charakterisierung der Funktion der CeLPLATs aus *C. elegans* (SEQ ID NO: 38 - 15 44) wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen cDNAs stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYes2.1Topo unter Verwendung des pY-es2.1TOPO TA Expression Kit (Invitrogen) kloniert, wobei pYes2-T06E8.1 und pYes2-F59F4.4 erhalten wurden.

Da die Expression der CeLPLATs zu einem effizienten Austausch der Acyl-Substrate 20 führen sollte, wurde weiterhin das Doppelkonstrukt pESCLeu-PpD6-Pse1 hergestellt, das die offenen Leserahmen einer Δ6-Desaturase (PpD6) und einer Δ6-Elongase (Pse1) aus *Physcomitrella patens* (siehe DE 102 19 203) beinhaltet. Die Nukleinsäuresequenz der Δ6-Desaturase (PpD6) und der Δ6-Elongase (Pse1) werden jeweils 25 in SEQ ID NO: 46 und SEQ ID NO: 48 wiedergegeben. Die korrespondierenden Aminosäuresequenzen sind SEQ ID NO: 47 und SEQ ID NO: 49 zu entnehmen.

Die *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme C13ABYS86 (Protease-defizient) und INVSc1 30 wurde mittels eines modifizierten PEG/Lithiumacetat-Protokolls gleichzeitig mit den Vektoren pYes2-T06E8.1 und pESCLeu-PpD6-Pse1 bzw. pYes2-F59F4.4 und pESCLeu-PpD6-Pse1 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem Vektor pESCLeu-PpD6-Pse1 und dem leeren Vektor pYes2 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplett-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil und Leucin. Nach der 35 Selektion wurden 4 Transformanten, zwei pYes2-T06E8.1/pESCLeu-PpD6-Pse1 und zwei pYes2-F59F4.4/pESCLeu-PpD6-Pse1 und eine pESCLeu-PpD6-Pse1/ pYes2 zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt. Die beschriebenen Experimente wurden auch im Hefestamm INVSc1 durchgeführt.

Für die Expression der CeLPAATs wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 2 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose, aber ohne Uracil und Leucin mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200rpm inkubiert. 5 ml

CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil und Leucin) mit 2% Raffinose, 1% (v/v) Tergitol NP-40 und 250 μ M Linolsäure (18:2^{Δ9,12}) oder Linolensäure (18:3^{Δ9,12,15}) wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,08 angeimpft. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,2-0,4 durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 48 h bei 20°C inkubiert.

5

Fettsäureanalyse

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 10 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden

10 Fettsäuremethylester (FAMEs) durch saure Methanolysen hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO₃, pH 15 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 μ l PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 20 50°C bis 250°C mit einer Rate 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (halten) programmiert. Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma).

20

25 Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma).

Acyl-CoA Analyse

Die Acyl-CoA-Analyse erfolgte wie bei Larson and Graham (2001; Plant Journal 25:

25 115-125) beschrieben.

Expressionsanalyse

Figuren 2 A und B sowie 3 A und B zeigen die Fettsäureprofile von transgenen C13ABYS86 Hefen, die mit 18:2^{Δ9,12} bzw. 18:3^{Δ9,12,15} gefüttert wurden. Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Alle

30 vier transgenen Hefen zeigen eine Synthese von 18:3^{Δ6,9,12} und 20:3^{Δ8,11,14} bzw. 18:4^{Δ6,9,12,15} und 20:4^{Δ8,11,14,17}, den Produkten der Δ-6- Desaturase und Δ-6-Elongase Reaktionen. Dies bedeutet, dass die Gene PpD6 und Pse1 funktional exprimiert werden konnten.

Figur 3 gibt wie oben beschrieben die Fettsäureprofile von transgenen C13ABYS86

35 S. cerevisiae-Zellen. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen intakter Zellen, die entweder mit den Vektoren pESCLeu-PpD6-Pse1/pYes2 (A) oder pYes2-T06E8.1/pESCLeu-PpD6-Pse1 (B) transformiert worden

waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von 18:2^{A9,12} kultiviert. Anschließend wurden die Fettsäuremethylester über GLC analysiert.

In den Kontroll-Hefen, die mit den Vektoren pESCLeu-PpD6-Pse1/pYes2 transformiert wurden, ist der Anteil von 20:3^{A8,11,14}, zu dem 18:3^{A6,9,12} durch Pse1 elongiert wird,

5 wesentlich niedriger als in den Hefen, die zusätzlich die LPLAT T06E8.1 exprimieren. Tatsächlich konnte die Elongation von 18:3^{A6,9,12} und 18:4^{A6,9,12,15} durch die zusätzliche Expression von CeLPLAT (T06E8.1) um 100-150% verbessert werden (Figur 4). Diese signifikante Erhöhung des LCPUFA-Gehalts ist nur wie folgt zu erklären: die exogen gefütterten Fettsäuren (18:2^{A9,12} bzw. 18:3^{A9,12,15}) werden zunächst in Phospholipide eingebaut und dort von der Δ-6-Desaturase zu 18:3^{A6,9,12} und 18:4^{A6,9,12,15} desaturiert. Erst nach Reäquilibrierung mit dem Acyl-CoA-Pool können 18:3^{A6,9,12} und 18:4^{A6,9,12,15} durch die Elongase zu 20:3^{A8,11,14}- bzw. 20:4^{A8,11,14,17}-CoA elongiert und dann wieder in die Lipide eingebaut werden. Die LPLAT T06E8.1 ist in der Lage, die Δ6-desaturierten Acylgruppen sehr effizient in CoA-Thioester zurückzuverwandeln. Interessanterweise

10 15 konnte auch die Elongation der gefütterten Fettsäuren 18:2^{A9,12} und 18:3^{A9,12,15} verbessert werden. (Figur 2 A und B bzw. 5 A und B).

Figur 5 gibt die Fettsäureprofile von transgenen C13ABYS86 *S. cerevisiae*-Zellen. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysie intakter Zellen, die entweder mit den Vektoren pESCLeu-PpD6-Pse1/pYes2 (A) oder pYes2-

20 T06E8.1/pESCLeu-PpD6-Pse1 (B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von 18:3^{A9,12,15} kultiviert. Anschließend wurden die Fettsäuremethylester über GLC analysiert.

Die Expression einer anderen CeLPLAT (F59F4.4) hat dagegen keinen Einfluss auf die Elongation (Figur 4). Offenbar kodiert F59F4.4 nicht für eine LPLAT. Nicht jede der

25 putativen LPLAT Nukleinsäuresequenzen ist also enzymatisch aktiv in der erfindungsgemäß gefundenen Reaktion.

Figur 4 gibt die Elongation exogen applizierter 18:2^{A9,12} bzw. 18:3^{A9,12,15} im Anschluss an ihre endogene Δ-6-Desaturierung (Daten aus Fig. 2 und 5) wieder. Die exogen gefütterten Fettsäuren werden zunächst in Phospholipide eingebaut und dort zu

30 18:3^{A6,9,12} und 18:4^{A6,9,12,15} desaturiert. Erst nach Reäquilibrierung mit dem Acyl-CoA-Pool können 18:3^{A6,9,12} und 18:4^{A6,9,12,15} durch die Elongase zu 20:3^{A8,11,14}- bzw. 20:4^{A8,11,14,17}-CoA elongiert und dann wieder in die Lipide eingebaut werden. Die LPLAT T06E8.1 ist in der Lage, die Δ-6-desaturierten Acylgruppen effizient in CoA-Thioester zurückzuverwandeln.

35 Diese Ergebnisse zeigen, dass die CeLPLAT (T06E8.1) nach Co-expression mit der Δ-6-Desaturase und Δ-6-Elongase zu einer effizienten Produktion von C20-PUFAs führt. Diese Ergebnisse sind dadurch zu erklären, dass die CeLPLAT (T06E8.1) einen effizienten Austausch der neusynthetisierten Fettsäuren zwischen Lipiden und dem Acyl-CoA-Pool ermöglicht (siehe Figur 6).

Figur 6 gibt die Acyl-CoA-Zusammensetzung transgener INVSc1 Hefen, die mit den Vektoren pESCLeu PpD6Pse1/pYes2 (A) oder pESCLeu-PpD6-Pse1/pYes2-T06E8.1 (B) transformiert worden waren, wieder. Die Hefezellen wurden in Minimalmedium ohne Uracil und Leucin in Gegenwart von 250 μ M 18:2^{Δ9,12} kultiviert. Die Acyl-CoA-Derivate wurden über HPLC analysiert.

Bei Verwendung des Hefe-Stammes INVSc1 zur Co-Expression von CeLPLAT (T06E8.1) zusammen mit PpD6 und Pse1 ergibt sich folgendes Bild: Kontrollhefen, die PpD6 und Pse1 exprimieren, enthalten wie schon bei Verwendung des Stammes C13ABYS86 gezeigt nur geringe Mengen des Elongationsprodukts (20:3^{Δ8,11,14} bei 10 Fütterung von 18:2 bzw. 20:4^{Δ8,11,14,17} bei Fütterung von 18:3; siehe Figur 7 A und 8 A). Bei zusätzlicher Expression von CeLPLAT (T06E8.1) erfolgt ein deutlicher Anstieg dieser Elongationsprodukte (siehe Figur 7 B und 8 B). Tabelle 5 zeigt, dass die zusätzliche Expression von CeLPLAT überraschenderweise eine 8-fache Erhöhung des Gehaltes an 20:3^{Δ8,11,14} (bei Fütterung von 18:2) bzw. 20:4^{Δ8,11,14,17} (bei Fütterung von 15 18:3) bewirkt. Daneben zeigt sich, dass auch C16:2^{Δ6,9} zu C18:2^{Δ6,9} effizienter elongiert wird.

Figur 7 ist das Fettsäure-Profile von transgenen INVSc1 *S. cerevisiae*-Zellen zu entnehmen. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen 20 intakter Zellen, die entweder mit den Vektoren pESCLeu-PpD6-Pse1/pYes2 (A) oder pYes2-T06E8.1/pESCLeu-PpD6-Pse1 (B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von 18:2^{Δ9,12} kultiviert. Anschließend wurden die Fettsäuremethylester über GLC analysiert.

Figur 8 gibt die Fettsäure-Profile von transgenen INVSc1 *S. cerevisiae*-Zellen wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen 25 intakter Zellen, die entweder mit den Vektoren pESCLeu-PpD6-Pse1/pYes2 (A) oder pYes2-T06E8.1/pESCLeu-PpD6-Pse1 (B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von 18:3^{Δ12,15} kultiviert. Anschließend wurden die Fettsäuremethylester über GLC analysiert.

5 Tabelle 5: Fettsäure-Zusammensetzung (in mol %) transgener Hefen, die mit den Vektoren pESCLeu PpD6Pse1/pYes2 (PpD6 Pse1) oder pESCLeu-PpD6-Pse1/pYes2-T06E8.1 (PpD6 Pse1 + T06E8) transformiert worden waren. Die Hefezellen wurden in Minimalmedium ohne Uracil und Leucin in Gegenwart von 250 μ M 18:2^{Δ9,12} oder 18:3^{Δ9,12,15} kultiviert. Die Fettsäuremethylester wurden durch saure Methanolysen ganzer Zellen gewonnen und über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert ($n = 4$) ± Standardabweichung wieder.

Fettsäuren	Fütterung mit 250 μ M		Fütterung mit 250 μ M	
	18:2 ^{Δ9,12}		18:3 ^{Δ9,12,15}	
	PpΔ6/Pse1	PpΔ6/Pse1+ T06E8	PpΔ6/Pse1	PpΔ6/Pse1+ T06E8
16:0	15,31 ± 1,36	15,60 ± 1,36	12,20 ± 0,62	16,25 ± 1,85
16:1 ^{Δ9}	23,22 ± 2,16	15,80 ± 3,92	17,61 ± 1,05	14,58 ± 1,93
18:0	5,11 ± 0,63	7,98 ± 1,28	5,94 ± 0,71	7,52 ± 0,89
18:1 ^{Δ9}	15,09 ± 0,59	16,01 ± 2,53	15,62 ± 0,34	15,14 ± 2,61
18:1 ^{Δ11}	4,64 ± 1,09	11,80 ± 1,12	4,56 ± 0,18	13,07 ± 1,66
18:2 ^{Δ9,12}	28,72 ± 3,25	14,44 ± 1,61	-	-
18:3 ^{Δ6,9,12}	3,77 ± 0,41	4,72 ± 0,72	-	-
18:3 ^{Δ9,12,15}	-	-	32,86 ± 1,20	14,14 ± 2,52
18:4 ^{Δ6,9,12,15}	-	-	5,16 ± 1,04	3,31 ± 1,15
20:2 ^{Δ11,14}	2,12 ± 0,86	4,95 ± 4,71	-	-
20:3 ^{Δ8,11,14}	1,03 ± 0,14	8,23 ± 1,59	-	-
20:3 ^{Δ11,14,17}	-	-	4,12 ± 1,54	6,95 ± 2,52
20:4 ^{Δ8,11,14,17}	-	-	1,34 ± 0,28	8,70 ± 1,11

10 Ein Maß für die Effizienz der LCPUFA-Biosynthese in transgener Hefe stellt der Quotient aus Gehalt der erwünschten Δ-6-Elongationsprodukt nach Δ-6-Desaturierung (20:3^{Δ8,11,14} bzw. 20:4^{Δ8,11,14,17}) zu Gehalt an zugefütterter Fettsäure (18:2^{Δ9,12} bzw. 18:3^{Δ9,12,15}) dar. Dieser Quotient beträgt 0,04 in INVSc1 Kontrollhefen, die PpD6 und Pse1 exprimieren, und 0,60 in Hefen die zusätzlich zu PpD6 und Pse1 CeLPLAT

exprimieren. In anderen Worten: der Gehalt an erwünschtem Δ -6-Elongationsprodukt nach Δ -6-Desaturierung bei Co-Expression von CeLPLAT beträgt 60% des Gehalts der jeweils zugefütterten Fettsäure. In Kontrollhefen beträgt dieser Gehalt nur ca. 4%. Dies bedeutet eine 15-fache Erhöhung der Effizienz der LCPUFA-Biosynthese in transgener 5 Hefe durch Co-Expression von LPLAT.

Interessanterweise bewirkt die Co-Expression von CeLPLAT nicht nur eine Erhöhung der genannten Elongationsprodukte 20:3 $^{\Delta 8,11,14}$ bzw. 20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$, sondern auch eine Erhöhung des Verhältnisses 20:3 $^{\Delta 8,11,14}$: 20:2 $^{\Delta 11,14}$ bzw. 20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$: 20:3 $^{\Delta 11,14,17}$. Dies bedeutet, dass in Anwesenheit der LPLAT die Δ -6-Elongase bevorzugt mehrfach 10 ungesättigte Fettsäuren (18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ und 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$) als Substrat verwendet, während bei Abwesenheit der LPLAT keine ausgeprägte Substratspezifität zu erkennen ist (auch 18:2 $^{\Delta 9,12}$ und 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$ werden elongiert). Grund hierfür können Protein-Protein- 15 Wechselwirkungen zwischen Δ -6-Elongase, Δ -6-Desturase und LPLAT oder posttranskriptionale Modifikationen (z.B. partielle Proteolyse) sein. Dies würde auch erklären, warum der oben beschriebene Anstieg von Δ -6-Elongationsprodukten bei Co-Expression von Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase und LPLAT bei Verwendung eines protease-defizienten Hefestamms geringer ausfällt.

Acyl-CoA Analysen von transgenen INVSc1 Hefen, die mit 18:2 $^{\Delta 9,12}$ gefüttert wurden, ergaben folgendes Ergebnis: in Kontrollhefen, die PpD6 und Pse1 exprimieren, ist kein 20 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ -CoA und 20:3 $^{\Delta 8,11,14}$ -CoA nachweisbar. Dies weist darauf hin, dass weder das Substrat (18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ -CoA) noch das Produkt (20:3 $^{\Delta 8,11,14}$ -CoA) der Δ -6-Elongase in Kontrollhefen in nachweisbaren Mengen vorhanden ist. Dies lässt darauf schließen, dass der Transfer von 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ aus Membranlipiden in den Acyl-CoA Pool nicht oder nicht richtig stattfindet. Das bedeutet, dass kaum Substrat für die vorhandene Δ -6- 25 Elongase zur Verfügung steht, was wiederum den geringen Gehalt an Elongationsprodukt in Kontrollhefen erklärt. INVSc1 Hefen, die zusätzlich zur PpD6 und Pse1 die CeLPLAT exprimieren und mit 18:2 $^{\Delta 9,12}$ gefüttert worden waren, weisen keine signifikanten Mengen an 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ -CoA auf, wohl aber 20:3 $^{\Delta 8,11,14}$ -CoA. Dies deutet darauf hin, dass LPLAT sehr effizient 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ aus den Membranlipiden in den Acyl-CoA- 30 Pool überführt. 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ -CoA wird dann von der Δ -6-Elongase elongiert, so dass kein 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ -CoA, wohl aber 20:3 $^{\Delta 8,11,14}$ -CoA nachweisbar ist.

b) Funktionelle Charakterierung der CeLPLATs in transgenen Pflanzen

Expression funktionaler CeLPLAT in transgenen Pflanzen

In DE 102 19 203 wurden transgene Pflanzen beschrieben, deren Samenöl durch 35 samenspezifische Expression funktioneller Gene kodierend für Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase und Δ -5-Desaturase geringe Mengen an ARA und EPA enthält. Der zur Transformation dieser Pflanzen benutzte Vektor ist SEQ ID NO: 56 zu entnehmen. Um den Gehalt an diesen LCPUFAs zu erhöhen, wurde in den genannten transgenen Pflanzen zusätzlich das Gen CeLPLAT (T06E8.1) in Samen exprimiert.

Zu diesem Zweck wurde der kodierende Bereich von CeLPLAT über PCR amplifiziert.

In Tabelle 6 sind die Primer wiedergegeben, die zur Klonierung eines weiteren Clones der ceLPLAT in binäre Vektoren verwendet wurden.

5 Tabelle 6: Nukleotidsequenzen der PCR-Primer zur Klonierung von CeLPLAT
(T06E8.1) in den binären Vektor pSUN3

Primer	Nukleotidsequenz
ARe503f*	5' TTAAGCGCGGCCGATGGAGAACTTCTGGTCG 3'
ARe504r*	5' ACCTCGGCGGCCGCCCTTTACTCAGATTC 3'

* f: forward, r: reverse

Das PCR-Produkt wurde in einen pENTRY Vektor zwischen USP Promotor und OCS-Terminator kloniert. Anschließend wurde die Expressionskassette in die binären Vektoren pSUN300 kloniert. Der entstandene Vektor wurde mit pSUN3CeLPLAT

10 (Figur 1) bezeichnet. Darüber hinaus wurde der kodierende Bereich von CeLPLAT amplifiziert und zwischen LegB4 Promotor und OCS-Terminator kloniert. Dieser Vektor wurde mit pGPTV CeLPLAT bezeichnet (Figur 9A).

Darüberhinaus wurde der kodierende Bereich von CeLPLAT über PCR amplifiziert und zwischen LegB4 Promotor und OCS-Terminator kloniert. Die hierfür verwendeten PCR

15 Primer wurden so ausgewählt, dass in das PCR-Produkt eine effiziente Kosaksequenz eingeführt wurde. Außerdem wurde die DNA-Sequenz von CeLPLAT so verändert, dass sie der codon usage von höheren Pflanzen angepasst war.

Folgende Primer wurden für die PCR verwendet:

Forward primer: 5'-ACATAATGGAGAACTTCTGGTCTATTGTTGTGTGTCTA-3'

20 Reverse primer: 5'- CTAGCTAGCTTACTCAGATTCCTCCGTCTTTGTTCTC-3'

Das PCR Produkt wurde in den Klonierungsvektor pCR Script kloniert und über die Restriktionsenzyme XmaI und SacI in den Vektor pGPTV LegB4-700 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde mit pGPTV LegB4-700 + T06E8.1 bezeichnet (Figur 9A).

25 Das gleiche PCR Produkt wurde darüber hinaus in einen Multigen-Expressionsvektor kloniert, der bereits die Gene für eine Delta-6-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* (SEQ ID NO: 69, Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 70) und einer Delta-6-Elongase aus *P. patens* enthielt. Das entstandene Plasmid wurde mit pGPTV USP/OCS-1,2,3 PSE1(Pp)+D6-Des(Pt)+2AT (T06E8-1) bezeichnet (Figur 9B). Die Sequenzen des Vektors sowie der Gene sind SEQ ID NO.:71, SEQ ID NO: 72,

SEQ ID NO: 73 und SEQ ID NO: 74 zu entnehmen. Die Δ -6-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* reicht von Nukleotid 4554 bis 5987 in der SEQ ID NO: 71. Die Δ -6-Elongase aus *Physcomitrella patens* reicht von Nukleotid 1026 bis 1898 und die der LPLAT aus *Caenorhabditis elegans* reicht von Nukleotid 2805 bis 3653 in der 5 SEQ ID NO: 71.

Tabakpflanzen wurden co-transformiert mit dem Vektor pSUN3CeLPLAT und dem in DE 102 19 203 und SEQ ID NO: 56 beschriebenen Vektor enthaltend Gene kodierend für Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase und Δ -5-Desaturase, wobei die Selektion transgener Pflanzen mit Kanamycin erfolgte.

10 Tabakpflanzen wurden außerdem transformiert mit dem Vektor pGPTV USP/OCS-1,2,3 PSE1(Pp)+D6-Des(Pt)+2AT (T06E8-1) [siehe SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 und SEQ ID NO: 74].

15 Lein wurde mit dem Vektor pSUN3CeLPLAT transformiert. Die entstandenen transgenen Pflanzen wurden mit solchen transgenen Leinpflanzen gekreuzt, die bereits geringe Mengen an ARA und EPA aufgrund der funktionellen Genexpression von Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase und Δ -5-Desaturase enthielten.

20 Weiterhin wurde Lein mit dem Vektor pGPTV LegB4-700 + T06E8.1 transformiert. Die entstandenen transgenen Pflanzen wurden mit solchen transgenen Leinpflanzen gekreuzt, die bereits geringe Mengen an ARA und EPA aufgrund der funktionellen Expression von Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase und Δ -5-Desaturase enthielten.

Die Samen von transgenen Tabak- und Leinpflanzen wurden wie weiter vorne beschrieben [Beispiel 3 b)] auf erhöhte Gehalte an LCPUFAs in untersucht.

25 Aus den hier vorliegenden Arbeiten lässt sich die Funktion der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase (LPLAT) wie in Figur 10 A und 10 B dargestellt ableiten. Der Biosynthese-Weg der LCPUFAS stellt sich damit wie folgt dar.

Desaturasen katalysieren die Einführung von Doppelbindungen in lipidgekoppelte Fettsäuren (*sn*2-Acyl-Phosphatidylcholin), während die Elongasen exklusiv die Elongation Coenzym A-veresterter Fettsäuren (Acyl-CoAs) katalysieren. Nach diesem Mechanismus erfordert die alternierende Wirkung von Desaturasen und Elongasen 30 einen ständigen Austausch von Acyl-Substraten zwischen Phospholipiden und Acyl-CoA-Pool und somit die Existenz einer zusätzlichen Aktivität, die die Acyl-Substrate in die jeweils notwendige Substratform, d.h. Lipide (für Desaturasen) oder CoA-Thioester (für Elongasen), überführt. Dieser Austausch zwischen Acyl-CoA Pool und Phospholipiden wird durch LCPUFA-spezifische LPLAT ermöglicht. Die Biosynthese von 35 ARA (A) erfolgt analog zu EPA (B), mit dem Unterschied, dass bei EPA der Δ -6-Desaturierung eine Δ -15-Desaturierung vorgeschaltet ist, so dass α 18:3-PC als Substrat für die Δ -6-Desaturase fungiert. Die Biosynthese von DHA macht einen weiteren Austausch zwischen Phospholipiden und Acyl-CoA-Pool über LPLAT notwendig: 20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$ wird vom Phospholipid- zum CoA-Pool transferiert und nach

erfolgter Δ -5-Elongation wird 22:5 Δ7,10,13,16,19 vom CoA- zum Phospholipid-Pool transferiert und schließlich durch Δ -4-Desaturase zu DHA umgesetzt. Gleches gilt für den Austausch im Biosyntheseweg unter Verwendung der Δ -8-Desaturase, der Δ -9-Elongase und der Δ -5-Desaturase.

5 Beispiel 5: Funktionelle Charakterierung der Acyltransferasen

Um die Substratspezifität von Acyltransferasen höherer Pflanzen und LCPUFA-produzierender Organismen zu vergleichen, wurden aus dem LCPUFA-produzierenden Organismus *Mortierella alpina* und aus Sonnenblume mikrosomale Fraktionen isoliert. Die GPAT- und LPAAT-Aktivitäten wurden mit verschiedenen Acyl-CoAs als Substrat 10 getestet.

Um zu überprüfen, ob der LCPUFA-Produzent *Thraustochytrium* tatsächlich DHA in der sn-2 Position der Lipide einbaut, wurde eine Positionsanalyse der Lipide durchgeführt.

15 Um LCPUFA-spezifische Acyltransferasen zu isolieren, wurde ausgehend von mRNA der LCPUFA-produzierenden Organismen *Thraustochytrium*, *Physcomitrella*, *Cryptocodium cohnii* und *Fusarium* cDNA-Banken, sowie einer *Shewanella* genomischen Bank erstellt und diese über DNA-Sequenzierung näher analysiert. Über Sequenzhomologien wurden Acyltransferaseklone identifiziert. Alternativ wurden über PCR-Techniken Acyltransferasen amplifiziert.

20 Transgene *E. coli* Zellen, Hefen, Insektenzellen und Pflanzenzellen mit erhöhter Expression mindestens einer LCPUFA-spezifischen Acyltransferase weisen einen erhöhten Gehalt an LCPUFAs in ihren Lipiden auf.

25 Beispiel 6: Isolierung mikrosomaler Fraktionen aus *Mortierella*, Sonnenblume und Leinsamen und Analyse der Substratspezifität von Acyltransferasen für verschiedene Acyl-CoAs.

Um herauszufinden, ob höhere Pflanzen, insbesondere Ölsaaten wie Sonnenblume, Lein, Raps oder Soja LCPUFAs in ihre Lipide einbauen können, wurden aus Sonnenblume und Leinsamen Mikrosomen präpariert und verschiedene Acyltransferase-Aktivitäten hinsichtlich ihrer Substratspezifität für LCPUFA-CoAs untersucht. Im einzelnen wurden GPAT-, LPAAT- und LPCAT-Aktivitäten untersucht. Diese Ergebnisse wurden verglichen mit den entsprechenden Acyltransferase-Aktivitäten der LCPUFA-Produzenten *Mortierella alpina*, der bekanntermaßen hohe Gehalte der LCPUFA Arachidonsäure in seinen Lipiden und im Triacylglycerin enthält (C. Ming et al. (1999) *Bioresource Technology* 67: 101-110).

35 Präparation mikrosomaler Membranen aus Cotyledonen reifender Samen von Sonnenblume und Lein

Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Die Cotyledonen von reifenden Sonnenblumen- und Leinsamen wurden ungefähr 10 Tage nach Anthesis geerntet und in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2), der 0,33 M Saccharose und 0,1 % BSA (fettsäurefrei) enthielt, suspendiert. Nach Zerkleinerung in einem Glashomogenisator 5 wurde das Homogenat bei 20.000 x g, 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Lage Miracloth filtriert und bei 100.000 x g in einer Ultrazentrifuge 90 Minuten lang zentrifugiert. Die pelletierten mikrosomalen Membranen wurden mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen und in einem kleinen Volumen Puffer resuspendiert, wobei ein Glashomogenisator verwendet wurde. Die mikrosomalen Membranpräparationen wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei 10 -80°C gelagert.

Präparation mikrosomaler Membranen aus Mortierella

Kulturen von Mortierella wurden nach 5 Tagen geerntet und auf Eis gestellt. Alle weiteren Arbeiten wurden bei 4°C ausgeführt. Das Mycelium wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2), der 0,33 M Saccharose, 0,1 % BSA (fettsäurefrei), 1000 units Katalase/ml und 1 mM Pefabloc enthielt, suspendiert. Die nachfolgenden Schritte wurden wie unter ‚Präparationen mikrosomaler Membranen aus Cotyledonen reifender Samen von Sonnenblume und Lein‘ beschrieben durchgeführt.

20 Acyl-CoA Substratspezifität von GPAT: Umsetzung einzelner Acyl-CoA Substrate in der Acylierung von [¹⁴C] Glycerin-3-phosphat

Die Spezifität der GPAT wurde untersucht, um zu überprüfen ob das Enzym eine Präferenz für bestimmte Acyl-CoAs hat, insbesondere, um zu ermitteln, ob die GPAT von Ölsaaten LCPUFA-CoAs umsetzt. Mikrosomale Membranen wurden inkubiert mit 0,5 mM (Mortierella) bzw. 0,2 mM (Sonnenblume und Leinsamen) eines der folgenden 25 Acyl-CoAs: Myristoyl-CoA (14:0-CoA), Palmitoyl-CoA (16:0-CoA), Palmitoleoyl-CoA (16:1-CoA), Stearyl-CoA (18:0-CoA), Oleoyl-CoA (18:1-CoA), Linoleoyl-CoA (18:2-CoA), Dihomo-gamma-linolenoyl-CoA (20:3-CoA) oder Arachidonyl-CoA (20:4-CoA) und 5 mM [¹⁴C] G3P. Mikrosomale Membranen (äquivalent 50 µg Protein bei Sonnenblume und Mortierella bzw. 150 µg Protein bei Leinsamen) wurden dem Reaktionsgemisch zugesetzt, um die Reaktion zu starten. Nach 5 Minuten Inkubationszeit 30 wurden die Lipide nach Bligh & Dyer extrahiert und die in komplexen Lipiden eingegebauten Radioaktivität bestimmt.

In Figur 11 und Tabelle 7a und 7b sind die GPAT-Aktivitäten von Mortierella, Sonnenblume und Leinsamen bei verschiedenen Acyl-CoA-Sustraten dargestellt.

35 Die GPAT von Mortierella baut ungesättigte Fettsäuren effizienter ein als gesättigte Fettsäuren. Oleat und Linoleat wurden mit ähnlichen Einbauraten umgesetzt (100% bzw. 90%). Der Einbau von polyungesättigten Fettsäuren (20:3-CoA und 20:4-CoA) war nur unwesentlich niedriger (80% bzw. 75%).

In mikrosomalen Membranen von Sonnenblume sind ebenfalls Oleat und Linoleat die besten Substrate für die GPAT (100% bzw. 85% Aktivität). Acyl-CoAs der gesättigten Fettsäuren Stearat und Palmitat werden nur ca. halb so gut eingebaut (40% bzw. 64%). Ähnliches gilt für 20:3-CoA (55%). Arachidonyl-CoA ist für GPAT von Sonnenblume ein relativ schlechtes Substrat (23%).

Die GPAT in mikrosomalen Membranen von Leinsamen hat die niedrigste spezifische Aktivität aller untersuchten GPAT-Enzyme. Mit 6 nmol/min/mg Protein ist sie nur halb so aktiv wie Sonnenblumen GPAT und 5 mal weniger aktiv als das Enzym aus Mortierella. Bezüglich der Substratspezifitäten verhält sich Die effizientesten Acyl-CoA-Substrate der GPAT aus Leinsamen sind wie bei Sonnenblume Oleat und Linoleat (100% bzw. 90%). Die Einbauraten der gesättigten Fettsäuren Stearat und Palmitat sind mit 65% und 90% deutlich höher als bei Sonnenblume. Arachidonyl-CoA hingegen ist für GPAT von Leinsamen ein äußerst schlechtes Substrat (5%).

Acyl-CoA Substratspezifität von LPAAT: Umsetzung einzelner Acyl-CoA Substrate bei der Acylierung von Lysophosphatidsäure

Die Spezifität der LPAAT wurde untersucht, um zu überprüfen, ob das Enzym eine Präferenz für bestimmte Acyl-CoAs hat, insbesondere, um zu ermitteln, ob die LPAAT von Ölsaaten LCPUFA-CoAs umsetzt. LPAAT Aktivität wurde in einem kontinuierlichen spektralphotometrischen Assay bestimmt, bei dem 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoat (DTNB) verwendet wurde, und die Änderung der Absorption bei 409 nm und 25°C verfolgt wurde (F.M. Jackson et al. (1998) Microbiology 144: 2639-2645). Der Assay enthielt sn-1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure (30 nmol), DTNB (50 nmol) und 20 nmol eines der folgenden Acyl-CoAs: Palmitoyl-CoA (16:0-CoA), Stearoyl-CoA (18:0-CoA), Oleoyl-CoA (18:1-CoA), Linoleoyl-CoA (18:2-CoA), Dihomo-gamma-linolensyl-CoA (20:3-CoA) oder Arachidonyl-CoA (20:4-CoA) in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2. Das in der Reaktion freigesetzte CoA wurde mit Hilfe der Anfangssteigung und des Extinktionskoeffizienten von 13,6 mM⁻¹ x cm⁻¹ quantifiziert. Mikrosomale Membranen (äquivalent 10 µg Protein bei Mortierella bzw. 40 µg Protein bei Sonnenblume und Leinsamen) wurden dem Reaktionsansatz zugesetzt, um die Reaktion zu starten.

In Figur 11 und Tabelle 7a und 7b sind die LPAAT-Aktivitäten von Mortierella, Sonnenblume und Leinsamen bei verschiedenen Acyl-CoA-Substraten dargestellt.

Die LPAAT von Mortierella baut Oleoyl-CoA am effizientesten ein (100%). Linoleoyl-CoA wird ebenfalls sehr gut umgesetzt (90%). Die gesättigten Fettsäuresubstrate 16:0-CoA und 18:0-CoA werden zu nur 40 % bzw. 36 % eingebaut, die LCPUFA-Substrate 20:3-CoA und 20:4-CoA hingegen mit einer relativ hohen Effizienz (je 65%).

In mikrosomalen Membranen von Sonnenblume ist Linoleoyl-CoA das am effizientesten in Phosphatidsäure eingebaute Substrat der LPAAT (250 % relativ zu Oleoyl-CoA). Sowohl gesättigte als auch polyungesättigte Acyl-CoA waren schlechte Substrate für Sonnenblumen LPAAT (relative Aktivitäten kleiner 20 %).

Ein ganz ähnliches Bild ergibt sich für LPAAT aus Leinsamen: Linoleoyl-CoA stellt das beste Substrat dar (120% relativ zu Oleoyl-CoA). Gesättigte Fettsäuren sind schlechte LPAAT-Substrate (25% und 30% für 16:0-CoA und 18:0-CoA). Arachidonyl-CoA wird am schlechtesten umgesetzt (19% relative Aktivität).

5 Acyl-CoA Substratspezifität von LPCAT: Umsetzung einzelner Acyl-CoA Substrate bei der Acylierung von Lysophosphatidylcholin

In höheren Pflanzen und Pilzen werden Fettsäuren zur Herstellung polyungesättigter Fettsäuren desaturiert, während sie mit Phosphatidylcholin (PC) verestert sind (A.K. Stobart und S. Stymne (1985) *Planta* 163: 119-125; F.M. Jackson et al. (1998)

10 Microbiology 144: 2639-2645). Die Beteiligung von PC bei der Desaturierung von Fettsäuren auch in Pilzen setzt voraus, dass es ein funktionierendes Transfersystem von Fettsäuren zu und von der sn-2-Position des PC gibt, ähnlich dem, wie es für entwickelnde Ölsamen beschrieben wurde (Jackson et al., 1998; Stobart et al., 1983). Es wird vermutet, dass dieser Transfer des Acylgruppe von Acyl-CoA zur sn-2 Position des PC durch LPCAT katalysiert wird. Hier wurde die Spezifität von LPCAT untersucht, um zu überprüfen, ob das Enzym eine Präferenz für bestimmte Acyl-CoAs hat, insbesondere, um zu ermitteln, ob die LPCAT von Ölsaaten LCPUFA-CoAs umsetzt.

LPCAT Aktivität wurde in einem kontinuierlichen spektralphotometrischen Assay bestimmt, bei dem 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoat (DTNB) verwendet wurde und die Änderung der Absorption bei 409 nm und 25°C verfolgt wurde. Der Assay enthielt sn-1-Palmitoyl-Lysophosphatidylcholin (30 nmol) als Acyl-Akzeptor, DTNB (50 nmol) und 20 nmol eines der folgenden Acyl-CoAs: Myristoyl-CoA (14:0-CoA), Palmitoyl-CoA (16:0-CoA), Palmitoleoyl-CoA (16:1-CoA), Stearoyl-CoA (18:0-CoA), Oleoyl-CoA (18:1-CoA), Linoleoyl-CoA (18:2-CoA), Dihomo-gamma-linolenoyl-CoA (20:3-CoA)

25 oder Arachidonyl-CoA (20:4-CoA) in 1 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2. Die Reaktion wurde durch Zugabe mikrosomaler Membranpräparation gestartet. Die Menge zugegebener mikrosomaler Membranenpräparation betrug 5 µg (Mortierella und Sonnenblume) bzw. 30 µg (Leinsamen). Das in der Reaktion freigesetzte CoA wurde mit Hilfe der Anfangssteigung und des Extinktionskoeffizienten von 13,6 mM⁻¹ x cm⁻¹ bei 409 nm quantifiziert.

In Figur 12 und Tabelle 7a und 7b sind die LPCAT-Aktivitäten von Mortierella, Sonnenblume und Leinsamen bei verschiedenen Acyl-CoA-Sustraten dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass LPCAT in mikrosomalen Membranen von Sonnenblume und Mortierella wesentlich aktiver ist als bei Leinsamen (siehe Tab. 10a und 10b).

35 Mortierella LPCAT setzt neben 18:1 (100 %) auch 18:2 (40%), 20:3 (85 %) und 20:4 (90%) sehr effizient um. Gesättigte Fettsäuren werden quasi nicht umgesetzt (relative Aktivität kleiner 25 %).

Sonnenblumen LPCAT setzt Oleoyl-CoA und Linoleoyl-CoA ähnlich gut um (100 % bzw. 120 % relative Aktivitäten). Palmitoyl-CoA und Stearoyl-CoA sind schlechte

Substrate (relative Aktivität kleiner 20 %). 20:3-CoA und 20:4-CoA werden quasi nicht umgesetzt (relative Aktivitäten kleiner 5 %).

Ähnlich verhält sich LPCAT aus Leinsamen: Oleoyl-CoA und Linoleoyl-CoA werden gleichermaßen gut umgesetzt, hingegen konnte für 20:3-CoA und 20:4-CoA keine

5 LPCAT-Aktivität nachgewiesen werden.

Diskussion der Daten zur Acyl-CoA-Spezifität von GPAT, LPAAT und LPCAT

Die Substratspezifität von G3P acylierenden Enzymen wurde intensiv untersucht, um den Mechanismus der Verteilung von Fettsäuren in Phospholipiden und Triacylglycerin zu verstehen. Mikrosomale GPAT von Säugetieren verwendet gesättigte und ungesättigte Acyl-CoAs (Yamada & Okuyama, 1978; Haldar et al., 1979; Tamai & Lands,

10 1974). Gleiches wurde für pflanzliche mikrosomale GPATs gezeigt (Frentzen, 1993; Bafor et al. 1990). Jackson et al. (1998) zeigten außerdem, dass weder GPAT noch LPAAT des Pilzes *Mucor circinelloides* eine ausgeprägte Substratspezifität für Acyl-CoAs aufweist. Gesättigte wie ungesättigte Fettsäuren werden bei *Mucor* an beiden

15 Positionen acyliert. Eine gereinigte GPAT der Membranfraktion von *Mortierella ramanniana* zeigte jedoch eine klare Präferenz für Oleoyl-CoA gegenüber Palmitoyl-CoA (Mishra & Kamisaka, 2001).

Um zu untersuchen, ob GPAT in mikrosomalen Membranen von *Mortierella*, Sonnenblume und Leinsamen eine starke Spezifität für bestimmte Acyl-CoA Spezies aufweist,

20 wurden einzelne Acyl-CoAs den Mikrosomen zugesetzt. Die GPAT von *Mortierella* weist insofern Ähnlichkeit zu anderen pflanzlichen, tierischen und pilzlichen GPATs auf, als sie eine breite Spezifität für Acyl-CoAs hat, d.h. gesättigte und ungesättigte Fettsäuren werden an der sn-1 Position von G3P acyliert. Auch die GPATs von

25 Sonnenblumen und Leinsamen mikrosomalen Membranen verwenden gesättigte und ungesättigte Acyldonatoren, in ähnlicher Weise, wie dies für Färberdistel und Turnip rape (Bafor et al., 1990) gezeigt wurde, allerdings mit einer Präferenz für ungesättigte Fettsäuren. Generell ist die *Mortierella* GPAT weniger diskriminierend wie das Sonnenblumen- und Leinsamenenzym. Auffällig ist allerdings, dass Sonnenblumen und Leinsamen GPATs Arachidonyl-CoA quasi gar nicht umsetzt, wogegen das *Mortierella*-

30 Enzym Arachidonyl-CoA sehr effizient acyliert.

Im zweiten Acylierungsschritt ist LPAAT von *Mortierella*, Sonnenblume und Leinsamen aktiv mit sn-1-Oleoyl Lysophosphatidsäure als Acylakzeptor. Ähnlich der GPAT weist auch LPAAT von *Mortierella* eine breite Spezifität für Acyl-CoAs auf. Diese Daten sind ähnlich denen aus Meerschweinchen und Rattenleber Mikrosomen, wo mit Ausnahme

35 von Stearyl-CoA LPAAT alle Acyl-CoAs mit 16 und 18 C-Atomen, unabhängig vom Sättigungsgrad verestert (Hill und Lands, 1968). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Sonnenblumen- und Leinsamen-LPAATs eine starke Spezifität zu Linoleat und Oleat. Gesättigte Fettsäuren hingegen wurden kaum umgesetzt. Diese Daten stimmen überein mit der Beobachtung, dass bei den meisten Ölsaaten LPAAT eine höhere Spezifität

40 für ungesättigte Fettsäuren zeigen (Griffiths et al., 1985; Ichihara et al., 1987). Bei Sonnenblume und Leinsamen ist Arachidonyl-CoA auch für LPAAT ein schlechtes

Substrat. Verglichen mit GPAT ist die LPAAT-Aktivität von Sonnenblume und Leinsamen aber etwas höher.

Die Spezifität von LPCAT in mikrosomalen Präparationen von Mortierella und Sonnenblume wurde ebenfalls untersucht. In Mortierella zeigte LPCAT ein breites Spektrum

5 der Substratspezifität auf. Die Aktivität des Enzyms mit verschiedenen Acyl-CoAs nahm in der Reihenfolge 18:1-CoA > 20:4-CoA > 20:3-CoA > 16:1-CoA > 18:2-CoA ab. LPCAT aus Sonnenblume und Leinsamen zeigte kaum Aktivität mit 20:3 und 20:4-CoA. LPCAT in Rinderhirn-Mikrosomen zeigten auch eine schwache Aktivität mit gesättigten Acyl-CoAs und eine größere Aktivität mit Linoleoyl- und Oleoyl-CoA (Deka et al., 1986). LPCAT von Rinder-Herzmuskel-Mikrosomen akzeptieren einen großen Bereich von Substraten, obwohl die Aktivität besonders hoch mit Arachidonyl-, Linoleoyl- und Oleoyl-CoA-Substraten ist (Sanjawara et al., 1988). In Pflanzen wurde die Acyl-Spezifität und Selektivität von LPCAT in Mikrosomen von Färberdistel (Stymne et al., 1983; Griffith et al., 1985) und Leinsamen (Stymne & Stobart, 1985a) untersucht. 10 Oleat und Linoleat wurden mit ungefähr der gleichen Umsatzrate an die sn-2-Position von PC acyliert. Die Aktivität mit alpha-Linoleat betrug nur etwa die Hälfte. Palmitat und Stearat waren wesentlich schlechtere LPCAT-Substrate, wenn sie als einzelne Acyl-CoAs angeboten wurden. Wurde eine Mischung aus gesättigten und ungesättigten Acyl-CoAs angeboten, so wurden Palmitat und Stearat vollständig vom PC ausgeschlossen. Auch LPCAT in mikrosomalen Membranen von *Mucor circinelloides* verwendet Oleoyl- und Linoleoyl-CoA wesentlich effizienter als gesättigte Fettsäuren. Es gibt also eine große Übereinstimmung bei der Spezifität von pflanzlicher, tierischer und pilzlicher LPCATs. Die Tatsache, dass LPCAT aus mikrosomalen Membranen von Mortierella nur eine schwache Aktivität mit Stearyl-CoA und eine gute Aktivität mit 15 Oleoyl- und Linoleoyl-CoA aufweist, könnte darauf hinweisen, dass Phosphatidylcholin als Substrat für Desaturasen dient. Es wurde demonstriert, dass Oleat an der sn-1 und der sn-2 Position von PC als Substrat für die Δ-12-Desaturase in Ölsaaten dient (Stymne & Stobart, 1986; Griffiths et al., 1988). Ähnliche Ergebnisse wurden für *Mucor circinelloides* berichtet (Jackson et al., 1998). Die Δ-6-Desaturase verwendet auch 20 Linoleat und der sn-2 Position von PC in mikrosomalen Membranpräparationen von *Mucor* (Jackson et al., 1998). Auch die Δ-6-Desaturase von Borreitsch verwendet ausschließlich Linoleat an der sn-2 Position des Phospholipids (Stymne & Stobart, 1986; Griffiths et al., 1988).

25 Die in Beispiel 6 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Acyltransferasen von Sonnenblume und Lein LCPUFAs wie Dihomo-γ-Linolenat und Arachidonat nicht effizient in die Membran- und Speicherlipide einbauen können. Obwohl LCPUFAs in Ölsaaten wie Sonnenblume, Lein oder Soja produziert werden können, indem die entsprechenden Biosynthesegene funktional exprimiert werden, ist davon auszugehen, dass die gebildeten LCPUFAs aufgrund fehlender Acyltransferase-Aktivitäten nicht 30 effizient in Triacylglycerin eingebaut werden, was zu einem niedrigen Ertrag führt. Zusätzlich zu LCPUFA-Biosynthesegenen (z.B. Desaturasen und Elongasen oder Polyketidsynthasen) müssen also Acyltransferasen mit einer hohen Spezifität für 35 LCPUFA-CoAs in Ölsaaten transformiert werden. Hierfür eignen sich Acyltransferasen 40

von LCPUFA-produzierenden Organismen wie Mortierella, Phaeodactylum, Cryptocodium, Physcomitrella, Euglena und Thraustochytrium.

Tabelle 7a und 7b geben die Aktivität und Acyl-Spezifität von Lein, Sonnenblume und Mortierella alpina Acyltransferasen wieder.

5 Tabelle 7a: Aktivität und Acyl-Spezifität von Lein- und Sonnenblume- Acyltransferasen

Enzymaktivität	Lein			Sonnenblume		
	GPAT	LPAAT	LPCA T	GPAT	LPAAT	LPCA T
Rate (nmol/min/mg protein) des Ölsäure-Einbaus	6	25	9	13	28	360
Prozentualer Einbau im Vergleich zum Ölsäureeinbau						
Myristoyl-CoA	100	30	0	57	16	1
Palmitoyl-CoA	90	25	5	64	15	13
Palmitololeoyl-CoA		140	180		140	90
Stearoyl-CoA	65	30	15	40	14	18
Oleoyl-CoA	100	100	100	100	100	100
Linoleoyl-CoA	90	120	100	85	250	120
20:3-CoA			0	55		3
Arachidonoyl-CoA	5	19	0	23	18	4

Tabelle 7b: Aktivität und Acyl-Spezifität von *Mortierella alpina* –Acyltransferasen

Enzymaktivität	<i>Mortierella alpina</i>		
	GPAT	LPAAT	LPCAT
Rate (nmol/min/mg protein) des Ölsäure-Einbaus	30	51	350
Prozentualer Einbau im Vergleich zum Ölsäureeinbau			
Myristoyl-CoA		55	0
Palmitoyl-CoA	66	40	25
Palmitoleoyl-CoA		70	60
Stearoyl-CoA	50	36	10
Oleoyl-CoA	100	100	100
Linoleoyl-CoA	90	90	40
20:3-CoA	80	65	85
Arachidonoyl-CoA	75	65	90

Beispiel 7: Positionsanalyse der Lipide von *Thraustochytrium*

5 In Beispiel 6 wurde gezeigt, dass LCPUFA-Produzenten wie *Mortierella* über membrangebundene Acyltransferase-Aktivitäten verfügen, die LCPUFA-CoAs in Membran- und Speicherlipide einbauen. Durch Positionsanalysen der Lipide von LCPUFA-Produzenten kann man Rückschlüsse auf die in-vivo-Aktivitäten der einzelnen Acyltransferasen ziehen. Daher wurde im folgenden untersucht, welche Fettsäuren an den 10 einzelnen Positionen der Lipide des DHA-Produzenten *Thraustochytrium* verestert sind.

a) Kultivierung von *Thraustochytrium* spec.(TS) ATCC 26185

Die Kultivierung des Pilzes TS erfolgte in TS-Flüssigkultur und durch Ausstreichen auf TS-Platten. Alle drei Wochen wurden die Pilze auf neue Platten überimpft, zwei Tage 15 bei 28°C gelagert und anschließend bei RT (ca. 23°C) aufbewahrt. Die Flüssigkultur wurde bei 30°C unter Schütteln inkubiert und nach 6 Tagen geerntet. Das Schütteln der Kultur unter Lichteinstrahlung erhöht die Lipidausbeute (Daten nicht gezeigt).

I) TS-Medium: (Bajpai et al. (1991) JAOCS 68: 507-514)

a) 10x Lösung A (g/l):

250 g/l	NaCl
50 g/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O
10 g/l	KCl
20 g/l	Na-Glutamat
2 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄
20 g/l	Glucose

Lösung autoklavieren.

10 b) 10x Lösung B (g/l)

200 g/l	Glucose
20 g/l	Hefeextrakt

Lösung B wurde sterilfiltriert.

c) 10x Lösung C (g/l)

15 2 g/l CaCO₃

Zum Lösen des CaCO₃ wurde die Lösung mit HCl angesäuert und anschließend autoklaviert.

d) 10x Lösung D (g/l)

1 g/l	KH ₂ PO ₄
1 g/l	NaHCO ₃

Die Lösung wurde autoklaviert.

Suplemente: Thiamin und Vitamin B₁₂

Zu 600 ml autoklaviertem dest. Wasser wurde je 100 ml der 10x Lösungen a) bis d) und 10 µg/l Thiamin und 1 µg/l Vitamin B₁₂ zugegeben

25 b) Lipidanalyse von Thraustochytrium (Bligh & Dyer (1959) Canadian J. Biochem. 37: 911-917)

Zur Extraktion der Gesamtlipide aus TS in Flüssigkultur wurden diese durch Zentrifugation bei 3000g für 10 Minuten sedimentiert. Nach Resuspension der Zellen in 10 ml 0,45% NaCl wurden diese für 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach einem weiteren

30 Zentrifugationsschritt (wie oben) der in 40 ml-Schliffgläschchen umgefüllten Suspension wurde das Sediment in Trichlormethan/Methanol 1:2 (v/v) aufgenommen. Dabei richtete sich das Volumen des Lösungsmittelgemisches nach dem Volumen des

Sedimentes. Im allgemeinen wurden für die Extraktion einer 100 ml-Kultur 10 ml des Gemisches benötigt. Die erste Extraktion fand für mindestens 6 Stunden, zumeist allerdings über Nacht bei 8°C auf einem Schüttler statt. Anschließend wurden die Zellreste erneut sedimentiert und der Überstand wurde bei 8°C aufbewahrt. Die zweite

5 Extraktion fand entsprechend der Ersten, allerdings mit Trichlormethan/Methanol 2:1 (v/v) über Nacht statt. Nach der zweiten Extraktion wurden die Zellreste erneut sedimentiert und der Überstand wurde mit dem der ersten Extraktion vereinigt. Die vereinigten Extrakte wurden dann auf das Verhältnis Trichlormethan/Methanol/0,45 % NaCl 2:1:0,7 eingestellt und geschüttelt. Dabei werden nicht erwünschte, coextrahierte 10 Substanzen wie Zucker ausgeschüttelt und gelangen in die wässrige Phase. Daraufhin wurde der Extrakt bis zur Phasentrennung zentrifugiert, die organische Unterphase abgenommen und zur Befreiung von Schwebstoffen durch Watte in einen Rundkolben filtriert. Der Lipidextrakt wurde am Rotationsverdamfer bis zur Trockene eingeengt, die Gesamtlipide wurden in Trichlormethan/Methanol 2:1 (v/v) und in ein Schliffglas- 15 röhrchen überführt. Dann wurde der Extrakt unter Stickstoff erneut bis zur Trockene eingeengt und abschließend in Trichlormethan/Methanol 2:1 (v/v) in einem definierten Volumen aufgenommen.

c) Lipidanalyse aus Thraustochytrium-Membranen

20 Isolierte Thraustochytrium-Membranen wurden in ein Schliffröhrchen überführt und in 0,45% NaCl aufgenommen und im Wasserbad 5 Minuten lang aufgekocht, um lipidabbauende Enzyme zu inaktivieren. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 3000 x g) wurde der wässrige Überstand dekantiert. Die Extraktion der Lipide erfolgte eine Stunde lang bei 4°C in Trichlormethan/Methanol (2:1). Nach Zugabe von 1/3 Volumen 0,45% NaCl wurden die Proben zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (5 Minuten, 25 3000 x g). Die untere, lipidhaltige Phase wurde entnommen und unter Vakuum eingeengt. Die Lipide wurden in einem geeigneten Volumen Trichlormethan aufgenommen.

30 Im direkten Anschluß wurden die Lipide auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, 20 x 20 cm, 0,25 mm Schichtdicke; Merck, Darmstadt) zur dünnenschicht-chromatographischen Trennung der Phospholipide mit geeigneten Standards aufgetragen. Als Laufmittel wurde Trichlormethan/Methanol/Eisessig/H₂O 91/30/4/4 (v/v/v/v) verwendet. Die Laufzeit betrug 1,5 Stunden. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wurden die Platten mit 2',7'-Dichlorfluorescein (Merck, Darmstadt; in 0,3% iso-Propanol) angefärbt und unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht.

d) Lipaseverdau der Thraustochytrium-Gesamtlipide

35 Der enzymatische Verdau erfolgt mittels Pankreaslipase (EC 3.1.1.3). Die hydrolytische Spaltung erfolgt an der Phasengrenze zwischen Fett und Wasser, wobei das Enzym in Triacylglycerolen (TAGs) spezifisch die randständigen Esterbindungen in *sn*-1 und *sn*-3-Position angreift. Intermediär werden 1,2- und 2,3-Diacyl-*sn*-glycerole angereichert, die anschließend zu *sn*-2 Monoacylglycerolen weiter verdaut werden. 40 Nach dünnenschichtchromatographischer Auf trennung und Gewinnung der *sn*-2 Mono-

acylglycerol-Fraktion wird die Fettsäure-Zusammensetzung der TAGs in der mittleren Position ermittelt.

5 In ein Glasschliffröhrchen wurden 50 mg des Gesamtlipides eingewogen. Nach Zusatz von 0,5 ml Tris-Puffer, 0,1 ml CaCl₂-Lösung und 0,25 ml Gallensalzlösung (0,05 % (w/v) Gallensalz; Sigma, Deisenhofen) wurde das Schliffröhrchen verschlossen. Das Gemisch wurde eine Minute lang durchmischt und anschließend eine Minute in einem Wasserbad bei 40°C vortemperiert, um die Probe zu emulgieren.

10 Die Hydrolyse erfolgte nach Zusatz von Pankreaslipase (EC 3.1.1.3; Sigma, Deisenhofen; 2 mg Lipase pro 5 mg Lipid; Lipase frisch gelöst in 0,5 ml Tris-Puffer) bei 38°C und hoher Schüttelfrequenz (möglichst 1200 U/min). Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zusatz von 1 ml HCl (6 N) und 1 ml Ethanol abgebrochen.

15 Das Reaktionsgemisch wurde im Zentrifugenglas 2 mal mit je 4 ml Diethylether extrahiert. Dabei wurde die obere etherische Phase abgenommen. Die verbleibende wässrige Phase wurde erneut mit Diethylether extrahiert. Die Entstehung von Emulsionen wurde bei jedem Extraktionsschritt zusätzlich durch Zentrifugation unterbunden. Die vereinigten etherischen Phasen wurden durch ausschütteln mit je 3 ml Wasser (dest.) gewaschen. Die organische Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 3000 x g wurde der klare Überstand abgenommen und das Natriumsulfatpellet erneut mit Diethylether ausgeschüttelt, wie oben angegeben zentrifugiert und die organischen Phasen vereinigt. Nach Einengung des Etherextraktes unter Vakuum wurde im direkten Anschluss der Extrakt auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, 20 x 20 cm, 0,25 mm Schichtdicke; Merck, Darmstadt) zur dünnsschicht-chromatographischen Trennung der Partialglyceride aufgetragen. Als Laufmittel (mobile Phase) wurde Diisopropylether-Eisessig 40:1 (v/v) 20 verwendet. Die Laufzeit betrug 35-45 Minuten. Nach Verflüchtigung des Lösungsmittels wurden die Platten mit 2',7'-Dichlorfluorescein (Merck, Darmstadt; in 0,3% iso-Propanol) angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die einzelnen Lipidfraktionen 25 wurden in folgender Reihenfolge aufgetrennt: Monoacylglycerole (sn-2 MAGs, unmittelbar über der Startlinie), Diacylglycerole (sn-1,2- und sn-2,3-DAGs) freie Fettsäuren (FFA) und die nicht umgesetzten TAGs.

30 Die MAG-Bande wurde von der Kieselgelplatte abgekratzt. Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der TAGs erfolgte durch Transmethylierung und anschließender gaschromatographischer Auf trennung der Fettsäure-Methylester (FAME).

Tris-Puffer:

35 1M Tris/HCl, pH mit HCl auf 8,0 einstellen

CaCl₂-Lösung

2,2% (w/v) CaCl₂

e) Lipaseverdau der *Thraustochytrium*-Membranlipide (Fischer et al., 1973)

Die Positionsanalyse der Membranlipide erfolgte durch enzymatische Hydrolyse der sn-2-Esterbindung mit Phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4).

5 Die isolierten Membranlipide wurden unter Vakuum eingeengt, mit 0,5 ml Hydrolysepuffer versetzt und 5 min lang mit dem Ultraschallstab dispergiert. Die Hydrolyse erfolgte bei RT nach Zugabe von 50 U der Phospholipase A₂. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 ml Trichlormethan/Methanol 2:1 (v/v) und 0,45% NaCl gestoppt. Die organische Unterphase wurde in ein neues Gefäß überführt, am Rotationsverdampfer eingeengt und in 200 µl Trichlormethan/Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen.

10 Im direkten Anschluss wurde der Ansatz auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, 20 x 20 cm, 0,25 mm Schichtdicke; Merck, Darmstadt) zur dünnsschicht-chromatographischen Trennung der Phospholipide aufgetragen. Als Laufmittel wurde Trichlormethan/Methanol/Eisessig/H₂O 91/30/4/4 (v/v/v/v) verwendet. Die Laufzeit betrug 1,5 Stunden. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wurden die Platten mit 2',7'-Dichlorfluorescein (Merck, Darmstadt; in 0,3% iso-Propanol) angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Interessante Banden wurden von der Kieselgelplatte abgekratzt, transmethyliert und anschließend am Gaschromatographen analysiert.

15

Hydrolysepuffer

20 0,1 M Borsäure, pH 8,0
 3 mM CaCl₂
 1,4 mM Na-Desoxycholat

f) Transmethylierung von Fettsäuren mit Na-Methylat (nach Lühs)

25 Lipidproben wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels bzw. nach Abkratzen von der Dünnschichtplatte (z.B. bei sn-2 Analyse der Gesamtlipide) mit 2 ml Na-methylatlösung zur Umesterung versetzt. Der Ansatz wurde gut geschüttelt und zur Transmethylierung der Fettsäuren ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1,5 ml iso-Octan zugegeben und vorsichtig zweimal geschüttelt. Der Ansatz wurde 30 Minuten lang bei 4°C gelagert, wobei die Fettsäure-Methylester (FAME) in die iso-Octanphase übergehen. Nachdem sich die Phasen deutlich getrennt hatten wurde die obere iso-Octanphase in ein GC-Gläschen abpipettiert und die Probe am Gaschromatographen gemessen.

30

Na-Methylatlösung

35 5 g Natriummethylat wurden in 800 ml Methanol (99%) mittels Magnetrührer bei 50°C gelöst und nach dem Abkühlen mit iso-Octan auf 1000 ml aufgefüllt.

g) Methylierung freier Fettsäuren mit methanolischer Schwefelsäure

In einem Pyrexröhren mit Gewindededeckel wurde 1 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure zu dem eingeengtem Lipidextrakt zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde lang bei 80°C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurde der Ansatz mit 1 ml 0,9% NaCl

5 versetzt und durchmischt. Anschließend wurde gleiches Volumen Hexan zugegeben, gut gemischt und der Ansatz bei 4°C, 30 Minuten lang bis zur Phasentrennung inkubiert. Die obere Hexanphase wurde in ein GC-Gläschen überführt und am Gaschromatographen analysiert.

Methanolische Schwefelsäure

10 Zu 100 ml Methanol (wasserfrei) wurden mit 2 ml Dimethoxypropane und 0,5 M H₂SO₄ zugegeben.

h) Gaschromatographische Analyse

Für die GC-Analysen wurden folgende Parameter des gaschromatographischen Systems eingehalten:

15	Gerätetyp	HP 6890 GC
	Injectör	HP GC Injector
	Detektor	Flammen Ionisations Detektor (FID), Temp. 250°C
	Säule	J&W DW23 50% Cyanopropyl/methylsiloxane, 30 m, 0,5 mm Durchmesser
20	Ofentemperatur	220°C
	Trägergas	Wasserstoff
	Autosampler	HP 7673, Einspritzmenge 1 µl Probe

i) Die Lipidanalyse der *Thraustochytrium*-Lipide lieferte folgende Ergebnisse

25

Lipidfraktion	Fettsäurezusammensetzung			
	16:0	22:3 ω -3	22:4 ω -3	22:6 ω -3
TAG gesamt	24 %	12 %	31 %	23 %
TAG sn-2	21 %	26 %		43 %
Membranlipide gesamt	16 %	13 %		23 %
Membranlipide sn-2	34 %	18 %		36 %

Die Ergebnisse zeigen, dass *Thraustochytrium* einen hohen Gehalt an DHA in seinen Lipiden besitzt. DHA stellt mit neben Palmitat die Hauptkomponente der Triacylglycerole dar und ist die dominierende Fettsäure der Membranlipide. Auffällig ist, dass DHA an der sn-2 Position sowohl des Triacylglycerols als auch der Membranlipide deutlich angereichert ist: 36-43% der Fettsäuren an der sn-2 Position ist DHA. Aufgrund dieser Daten kann man davon ausgehen, dass *Thraustochytrium* über eine aktive LPAAT verfügt, die eine hohe Spezifität für DHA-CoA aufweist.

5 Beispiel 8: Isolierung von Gesamt-RNA und poly(A)⁺-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen wie Lein und Raps etc. erfolgte nach einer bei Logemann et al. beschriebenen Methode (Anal. Biochem. (1987) 163: 21). Aus dem Moos *Physcomitrella patens* kann die Gesamt-RNA aus Protonema-Gewebe nach dem GTC-Verfahren (Reski et al. (1994) Mol. Gen. Genet. 244: 351-359) gewonnen werden.

10 a) RNA Isolierung aus *Thraustochytrium*, *Cryptecodinium* und *Shewanella*:

15 Tiefgefrorene Algenproben (-70°C) wurden in einem eiskaltem Mörser unter Flüssigstickstoff zu feinem Pulver zerreiben. 2 Volumen Homogenisationsmedium (12,024 g Sorbitol, 40,0 ml 1 M Tris-RC1, pH 9 (0,2 M); 12,0 ml 5 M NaCl (0,3 M), 8,0 ml 250 mM EDTA, 761,0 mg EGTA, 40,0 ml 10% SDS wurden auf 200 ml mit H₂O aufgefüllt und der pH auf 8,5 eingestellt) und 4 Volumen Phenol mit 0,2% Mercaptoethanol wurden

20 bei 40-50°C unter gutem Mischen zu gefrorenem Zellpulver gegeben. Danach wurden 2 Volumen Chloroform hinzugefügt und für 15 min kräftig gerührt. Es wurde 10 min bei 10000g zentrifugiert und die wässrige Phase mit Phenol/Chloroform (2Vol/2Vol) und abschließend mit Chloroform extrahiert.

25 Das erhaltene Volumen der wässrigen Phase wurde mit 1/20 Vol 4 M Na-Aacetat (pR 6) und 1 Vol Isopropanol (eiskalt) versetzt und die Nukleinsäuren bei -20°C ÜN (= über Nacht) gefällt. Es wurde 30 min bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand abgesogen. Es folgte ein Waschschritt mit 70% EtOH und erneute Zentrifugation. Das Sediment wurde in Tris-Borat-Puffer (80 mM Tris-Borat-Puffer, 10 mM EDTA, pH 7,0). Dann wurde der Überstand mit 1/3 Vol 8 M LiCl versetzt, gemischt 30 min bei 4°C

30 inkubiert. Nach erneutem zentrifugieren wurde das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und das Sediment anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA erfolgte unter Verwendung von Dyna Beads (Dynal, Oslo, Finnland) nach den Anweisungen im Protokoll des Herstellers.

35 Nach der Bestimmung der RNA- oder poly(A)⁺-RNA-Konzentration wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumina 3 M Natriumacetat, pH 4,6, und 2 Volumina Ethanol gefällt und bei -70°C aufbewahrt.

Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehydhaltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt (Amasino (1986) Anal. Biochem. 152: 304).

5 Beispiel 9: Konstruktion von cDNA-Banken

Zur Konstruktion der cDNA-Banken aus *Physcomitrella*, *Thraustochytrium* und *Fusarium* wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus (Roche, Mannheim, Deutschland} und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und

10 RNAse H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt: Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt. Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt.

15 EcoRI/Xhol-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert, mit Xhol nachgeschnitten und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme ligiert und in lambda-ZAPII-Phagen oder lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande} verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

25 Beispiel 10: DNA-Sequenzierung und Computeranalyse

cDNA-Banken, wie im Beispiel 9 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung nach Standardverfahren, insbesondere durch das Ketteterminationsverfahren unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland), verwendet. Die Sequenzierung zufälliger,

30 vereinzelter Klone wurde anschließend an die präparative Plasmidgewinnung aus cDNA-Banken über in vivo-Massenexcision und Retransformation von DH10B auf Agarplatten durchgeführt (Einzelheiten zu Material und Protokoll von Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Plasmid-DNA wurde aus über Nacht gezüchteten *E. coli*-Kulturen, die in Luria-Brühe mit Ampicillin (siehe Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)) gezüchtet worden waren, an einem Qiagen-DNA-Präparations-Roboter (Qiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers präpariert. Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

40 5'-CTAAAGGAAACAAAGCTG-3'

5'-TGTAAAACGACGCCAGT-3'

Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Standard-Softwarepaketes EST-MAX, das kommerziell von Bio-Max (München, Deutschland) geliefert wird, prozessiert und annotiert. Durch Nutzung von Vergleichsalgorithmen und unter Verwendung einer Suchsequenz wurde mit Hilfe des BLAST-Programms nach homologen Genen gesucht (Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402).

Beispiel 11: Identifikation von Genen mittels Hybridisierung

Gensequenzen lassen sich zur Identifikation homologer oder heterologer Gene aus cDNA- oder genomischen Banken verwenden.

Homologe Gene (d.h. Vollängen-cDNA-Klone, die homolog sind, oder Homologe) lassen sich über Nukleinsäurehybridisierung unter Verwendung von beispielsweise cDNA-Banken isolieren: Je nach der Häufigkeit des Gens von Interesse werden 100000 bis zu 1000000 rekombinante Bakteriophagen plattiert und auf eine Nylonmembran überführt. Nach der Denaturierung mit Alkali wird die DNA auf der Membran z.B. durch UV-Vernetzung immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgt bei hochstringenten Bedingungen. In wässriger Lösung werden die Hybridisierung und die Waschschritte bei einer Ionenstärke von 1 M NaCl und einer Temperatur von 68°C durchgeführt. Hybridisierungssonden wurden z.B. durch Markierung mittels radioaktiver (32P) Nicktranskription (High Prime, Roche, Mannheim, Deutschland) hergestellt. Die Signale werden mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Partiell homologe oder heterologe Gene, die verwandt, aber nicht identisch sind, lassen sich analog zum oben beschriebenen Verfahren unter Verwendung niedrig-stringenter Hybridisierungs- und Waschbedingungen identifizieren. Für die wässrige Hybridisierung wurde die Ionenstärke gewöhnlich bei 1 M NaCl gehalten, wobei die Temperatur nach und nach von 68 auf 42°C gesenkt wurde.

Die Isolierung von Gensequenzen, die nur zu einer einzelnen Domäne von beispielsweise 10 bis 20 Aminosäuren Homologien aufweisen, lässt sich unter Verwendung synthetischer, radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden durchführen. Radioaktiv markierte Oligonukleotide werden mittels Phosphorylierung des 5'-Endes zweier komplementärer Oligonukleotide mit T4-Polynukleotidkinase hergestellt. Die komplementären Oligonukleotide werden aneinander hybridisiert und ligiert, so dass Konkatenere entstehen. Die doppelsträngigen Konkatenere werden beispielsweise durch Nicktranskription radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgt gewöhnlich bei niedrig-stringenten Bedingungen unter Verwendung hoher Oligonukleotidkonzentrationen.

Oligonukleotid-Hybridisierungslösung:

6 x SSC

0,01 M Natriumphosphat

1 mM EDTA (pH 8)

5 0,5% SDS

100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA

0,1% fettarme Trockenmilch

Während der Hybridisierung wurde die Temperatur schrittweise auf 5-10°C unter die berechnete Oligonukleotid-Tm oder bis auf Raumtemperatur (RT = 23°C in

10 allen Experimenten, wenn nicht anders angegeben) gesenkt, gefolgt von Wasch-
schritten und Autoradiographie. Das Waschen wurde mit extrem niedriger Stringenz
durchgeführt, zum Beispiel 3 Waschschritte unter Verwendung von 4 x SSC. Weitere
15 Einzelheiten sind wie von Sambrook, J., et al. (1989), „Molecular Cloning: A Laboratory
Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994)
„Current Protocols in Molecular Biology“, John Wiley & Sons, beschrieben.

Beispiel 12: Isolierung und Klonierung eines Vollängenklons für LPAAT aus Thraustochytrium**Durchmustern einer cDNA-Bank von Thraustochytrium**

Entsprechend unter Beispiel 9 beschrieben, wurde eine cDNA Bank von Thrausto-

20 chytrium erstellt. Im nächsten Schritt wurde die Phagenbank nach Herstellerangaben
mittels eines Helperphagen in eine Plasmidbank umgesetzt. Die Plasmidbank wurde
auf LB-Medium, 0,8 % Agar, 100 mg/ L Ampicillin ausplattiert und inkubiert. Gewach-
sene Bakterienkolonien wurden zufällig ausgewählt, in Flüssigmedium (LB, 100 mg/ L
Ampicillin) angezogen und wie in Beispiel 10 beschrieben, einer Sequenzierung unter-
25 worfen.

Die erhaltenen Sequenzen wurden nach Redundanzen durchsucht und diese entfernt.
Dadurch konnte ein Sequenzsortiment erhalten werden, dass ein Unigen-Set be-
schreibt. Dieses Sequenz-Set wurde in die Pedant-Datenbank (Biomax AG, Martins-
ried, Deutschland) eingelesen. Mittels BLAST Analyse anhand von konservierten

30 Bereichen innerhalb von Acyltransferasen wurde ein kurzes Sequenzstück mit
niedriger Ähnlichkeit zu bekannten Acyltransferasen gefunden. Die vorhandene
Sequenzinformation wurde verwendet, um Primer zu generieren (LPAAT069-5' und
LPAAT069-3'). Mit diesem Fragment wurde dann in der cDNA-Bank nach einem
Vollänge-Klon gesucht (Tabelle8).

Tabelle 8: Sequenzen der eingesetzten Primer;

Die Schmelztemperatur T_m ($^{\circ}$ C) der Oligonukleotide wurde nach Suggs et al. (1981) berechnet: T_m ($^{\circ}$ C) = 4 (G+C) + 2 (A+T) T_m -Werte in Klammern beziehen sich auf tatsächlich bindende Nukleotide von Primern, deren Enden durch zusätzlich eingeführte Schnittstellen modifiziert wurden.

5

Primer	Sequenz	T_m ($^{\circ}$ C)
LPAAT069-5'	5'-GCT ACA TTG CCA TGG AGC-3'	56
LPAAT069-3'	5'-GCT ACA AGA GGT CAG GTC G-3'	59
ACtrau-5'	5'-CTG GAT CCA TGA GCG CGT GGA CGA G-3'	69 (52)
ACtrau-3'	5'-TTG GAT CCC AAG AGG TCA GGT CGG A-3'	66 (54)
ACtrau-3' stop	5'-TTG GAT CCC TAC AAG AGG TCA GGT CG-3'	66 (48)
YES-HIS-5'	5'-CTG AGC TCA TGA GCG CGT GGA G-3'	69 (56)
YES-HIS-3'	5'-ATG GAT CCG TGA TGG TGA TGG TGA TGC AAG AGG TC-3'	72 (40)

Bei den PCR-Experimenten wurden die unten angegebenen Bestandteile eines PCR-Standardansatzes auf Eis in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, in den Thermoblock

10 gestellt und das unten dargestellte Temperaturprofil gestartet. Als Polymerase wurde in fast allen Fällen die Taq-Polymerase (Gibco BRL) eingesetzt. Lediglich bei Amplifikationen im Rahmen der funktionalen Expression in *E. coli* JC201 wurde die Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet. Die Zugabe der Polymerase erfolgte bei allen Experimenten über einen sogenannten "Heißstart", bei dem das Enzym erst nach 15 5 min Denaturierung des DNA-Templates zugegeben wird. Die Annealingtemperaturen (T_a) wurden 3-5 $^{\circ}$ C unter der mittleren Schmelztemperatur T_m der Primerpaare gewählt.

PCR-Standardansatz (für Taq-Polymerase)

5 μ l 10 x PCR-Puffer (100 mM Tri-HCl, pH 8,3; 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl)

1 μ l dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP u. dCTP)

20 1 μ l Primer 1 (30 μ M)

1 μ l Primer 2 (30 μ M)

1 U Taq-Polymerase

50-100 ng Plasmid-DNA-Template

mit Aqua dest. auf 50 μ l auffüllen

Heißstartprogramm

1. Denaturierung 95°C, 5 min
2. Heißstart 25°C, 3 min → Zugabe der Polymerase
3. Denaturierung 94°C 30 s

5 4. Annealing T_m -5°C, 30 s

5. Polymerisation 72°C, 1 - 3 min (für 1,0 kbp ca. 60 s)
Die Schritte 3. bis 5. wurden 25 bis 30 mal zyklisch wiederholt.

6. Polymerisation 72°C, 5 min

7. Termination 4°C

10 a) Nichtradioaktive Markierung von DNA

DNA-Sonden wurden nichtradioaktiv mit dem "PCR DIG PROBE SYNTHESIS KIT" (Boehringer Mannheim) markiert. Dabei wurden DNA-Fragmente in einer PCR-Reaktion mit Digoxigenin-markierten Desoxyuridintriphosphat (DIG-dUTP) markiert.

15 Die Detektion erfolgte anschließend mittels eines Anti-Digoxygenin-Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, und Zugabe von Chemilumineszenz- oder Farbsubstraten.

Um Hintergrundsignale zu vermeiden, die auf Vektorsequenzen zurückzuführen sind, 20 wurde für die PCR-Markierung zunächst in einer ersten PCR mit unmarkierten dNTPs die gewünschte DNA amplifiziert, das lineare Fragment über ein Agarosegel gereinigt und als Template für die eigentliche PCR-Markierung benutzt, bei der wieder das Primerpaar der ersten PCR eingesetzt wurde. Die Durchführung der Markierungsreaktion richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Die gewählten Primerkombinationen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Primer	Sequenz
LPAAT069-5'	5'- GCT ACA TTG CCA TGG AGC -3'
LPAAT069-3'	5'- GCT ACA AGA GGT CAG GTC G -3'

b) Screening einer cDNA-Bank

30 Zur Isolation eines vollständigen Klons wurde eine *Thraustochytrium* cDNA-Bank (in λ TriplEx2) mit der DIG-markierten Sonde abgesucht. Die Erstellung der Sonde erfolgte mit den Primern LPAAT069-3' und LPAAT069-5, abgeleitet von dem EST-Klon s_t002038069 bekannten cDNA-Sequenz die möglicherweise für eine LPAAT aus *Thraustochytrium* kodiert.

35 Es wurden je 5×10^4 Plaques auf 10 große NZY-Platten, entsprechend den Angaben des Herstellers (Stratagene) ausplattiert. Für den Transfer der Phagen auf Nitrocellulose-Filter (HybondTM-C, Amersham) wurden die Filter 1 min auf die Platten gelegt und

ihre genaue Lage durch 3 Einstiche mit einer Kanüle markiert. Anschließend wurden die Filter mit der Abdruckseite nach oben zunächst 5 min mit Denaturierungs-Lösung, dann 5 min mit Neutralisierungs-Lösung und schließlich 15 min mit 2 x SSC-Lösung behandelt. Dies erfolgte auf 3 Bögen Whatman 3 MM Papier, die mit den Lösungen

5 getränkt waren. Nach fünfminütigem Trocknen der Filter wurde die DNA durch UV-Behandlung mit 0,12 Joule/cm² (UV-Crosslinker, Hoefer Scientific Instruments) fixiert. Hybridisierung und kolorimetrische Detektion erfolgten mit dem "Dig System für Filter Hybridisierung" von Boehringer (Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers. Als Hybridisierungs-Puffer wurde Standard-Puffer verwendet, wobei die

10 Hybridisierung in 80 ml Hybridisierungs-Puffer mit 15 µl des Sonden-PCR-Ansatzes durchgeführt wurde. Nach erfolgter Detektion wurden die genaue Lage der Signale sowie die drei Orientierungspunkte der Filter auf Plastikfolien übertragen, um mit diesen als Schablone die positiven Plaques auf den Platten zu identifizieren. Diese wurden dann mit einem abgeflammt Korkbohrer (Durchmesser 5 mm) ausge-

15 stochen, in 1 ml SM-Puffer mit 20 µl CHCl₃ überführt und die Phagen aus den Agarstückchen über Nacht bei 4°C eluiert. Ein exaktes Ausstechen der Plaques war durch deren hohe Dichte und geringe Größe kaum möglich. Daher werden in der Regel ein bis zwei "Rescreens" durchgeführt. In diesem Fall wurden die Phagenlysate mittels PCR und den Primern LPAAT069-3' und LPAAt-5 auf Fragmente von ca. 570 bp

20 untersucht. Dazu wurden Aliquots der Phagenlysate mit EDTA (Endkonzentration 10 mM) versetzt und daraus 1 µl für die PCR als Template eingesetzt. Mit positiven Lysaten wurden in-vivo-Exzisionen nach Angaben des "ZAP-cDNA® Gigapack® II Gold Cloning Kit" (Stratagene) durchgeführt, wobei von den infizierten SOLR-Zellen statt der angegebenen 10-50 µl nur 2µl auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht

25 bei 37°C inkubiert wurden. Die Plasmide der erhaltenen Kolonien wurden direkt mittels PCR und den Primern LPAAT-3' und LPAAT-5' untersucht. Dazu wurden "Pools" erstellt, indem je 6 Kolonien mit sterilen Zahnstochern in einem Eppendorfreaktionsgefäß in 20 µl Aqua dest. eingerieben wurden, 3 x eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen zu lysieren, 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert und vom Überstand 2 µl

30 als Template in die PCR-Reaktion eingesetzt. Positive "Pools" wurden vereinzelt, die Plasmide über Plasmid-Minipräparationen isoliert und über PCR, Restriktionsanalysen sowie DNA-Sequenzierungen analysiert.

Schließlich wurde ein Vollängenklon für LPAAT aus *Thraustochytrium* identifiziert, dessen DNA-Sequenz in SEQ ID NO:1 dargestellt ist. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO:2 gezeigt.

NZY-Medium (pro Liter, NZY-Platten mit 15 g Agar)

5 g NaCl
5 g Hefeextrakt
10 g NZ-Amin (Caseinhydrolysat)
5 pH 7,5 (NaOH)
2 g MgSO₄ (sterilfiltriert)

Denaturierungs-Lösung

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

10 Neutralisierungs-Lösung

1,0 M Tris-HCl, pH 7,5
1,5 M NaCl

20 x SSC

3,0 M NaCl
15 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

Standard-Puffer

5 x SSC
0,1% (w/v) N-Laurylsarcosin
0,02% (w/v) SDS

20 1% Blocking Reagens

SM-Puffer (pro Liter)

5,8 g NaCl
2, g MgSO₄
50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5
25 5 ml 2% Gelatine

Beispiel 13: Isolierung und Klonierung von Vollängenklonen für PUFA spezifische Acyltransferasen aus *Physcomitrella patens*, *Mortierella alpina* und *Shewanella hanedai*

Wie unter Beispiel 8 und 9 beschrieben, wurde aus *Physcomitrella patens* und *Mortierella alpina* RNA isoliert und eine cDNA-Bank hergestellt.

Im nächsten Schritt wurde die Phagenbank nach Herstellerangaben mittels eines Helperphagen in eine Plasmidbank umgesetzt. Die Plasmidbank wurde auf LB-Medium, 0,8 % Agar, 100 mg/ L Ampicillin ausplattiert und inkubiert. Gewachsene Bakterien-

kolonien wurden zufällig ausgewählt, in Flüssigmedium (LB, 100 mg/ L Ampicillin) angezogen und wie in Beispiel 10 beschrieben, einer Sequenzierung unterworfen.

Die erhaltenen Sequenzen wurden nach Redundanzen durchsucht und diese entfernt. Dadurch konnte ein Sequenzsortiment erhalten werden, dass ein Unigen-Set be-

5 schreibt. Dieses Sequenz-Set wurde in die Pedant-Datenbank (Biomax AG, Martinsried, Deutschland) eingelesen. Mittels BLAST Analyse anhand von konservierten Bereichen innerhalb von Acyltransferasen wurden kurze Sequenzstücke mit niedriger Ähnlichkeit zu bekannten Acyltransferasen gefunden (Tabelle 9). Die vorhandene Sequenzinformation wurde verwendet, um Primer zu generieren (Tabelle 10). Mit 10 diesen Primern konnten die Volllänge-Klone amplifiziert werden.

Für die Acyltransferase aus *Shewanella hanedai* wurde die öffentliche Datenbank von *Shewanella putrefaciens* MR1 (TIGR Datenbank <http://tigrblast.tigr.org/ufmg/>) nach Acyltransferasen durchsucht. Es konnte eine Sequenz in der Datenbank mit Homologie zu Acyltransferasen gefunden werden. Von dieser Sequenz wurde ein PCR- 15 Fragment generiert mittels Standard-Primer T7 und T3. Das erhaltene Produkt wurde wie in Beispiel 10 a) und b) erläutert, markiert und zum Durchsuchen einer genomischen *Shewanella hanedai* Bank eingesetzt.

Genomische DNA aus *Shewanella hanedai* wurde nach folgendem Protokoll isoliert: Eine 100 ml Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 30°C angezogen.

20 Davon wurden 60 ml abzentrifugiert bei 3000 xg für 3 min. Das Pellet wurde in 6 ml doppelt-destilliertem H₂O resuspendiert und auf 1,5 ml Gefäße verteilt, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit 200 µl Lösung A, 200 µL Phenol/ Chloroform (1:1) und 0,3 g Glaskugeln durch Vortexen resuspendiert und lysiert. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer pH 8,0 wurde für 5 min zentrifugiert. Der Überstand 25 wurde einer Ethanolfällung mit 1 ml Ethanol unterzogen. Das erhaltene Pellet nach Fällung wurde in 400 µL TE-Puffer pH 8,0 + 30 µg/mL RnaseA gelöst. Nach Inkubation für 5 min bei 37°C wurden 18 µL 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,8 und 1 mL Ethanol zugegeben und die präzipitierte DNA durch Zentrifugation pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 25 µL doppelt-destilliertem H₂O gelöst. Die Konzentration der genomischen 30 DNA wurde durch deren Absorption bei 260 nm bestimmt.

Lösung A:

2 % Triton-X100

1 % SDS

0,1 M NaCl

5 0,01 M Tris-HCl pH 8,0
0,001 M EDTA

Die erhaltene genomische DNA wurde 1 Stunden bei 25 °C mit dem Restriktionsenzym Sau3A (New England Biolabs) nach Herstellerangaben inkubiert. Die erhaltene Fragmente wurden dann in einen mit BamHI verdautes pUC18 Plasmid mittels T4 Ligase (Roche) ligiert. Die erhaltene Bank wurde dann in gleicherweise wie in Beispiel 10 beschrieben, durchsucht. Es konnte ein Klon mit einem 1,7 kb grosses genomisches Fragment gefunden werden, der eine 687 bp lange codierende Sequenz mit Ähnlichkeit zu Acyltransferasen zeigt.

15 Die Sequenz aus *Shewanella hanedai* zeigt eine besonders hohe Ähnlichkeit zu der LPCAT aus *Chaenorhabditis elegans*. Die Ähnlichkeit der beiden Sequenzen auf Aminosäureebene beträgt 26 %.

Tabelle 9: Identifizierte Acyltransferase aus den genannten cDNA-Banken

Klon-Nr.	Organismus	Homologie zu
MaLPAAT1.1	<i>M. alpina</i>	LPAAT
MaLPAAT1.2	<i>M. alpina</i>	LPAAT
ShLPAAT	<i>S. hanedai</i>	LPAAT
T6	<i>Thrausto.</i>	LPAAT
pp004064045r	<i>P. patens</i>	LPAAT
pp020064227r	<i>P. patens</i>	LPAAT
pp015052144r	<i>P. patens</i>	GPAT/LPAT
pp004034225r	<i>P. patens</i>	GPAT
pp004104272r	<i>P. patens</i>	Ca-LPAAT
pp020018156r	<i>P. patens</i>	Ca-LPAAT
pp015034341r	<i>P. patens</i>	LPAAT
pp015033362r	<i>P. patens</i>	LCAT
Fg003028298	<i>Fusarium</i>	LCAT

Tabelle 10: Sequenzen der eingesetzten Primer;

Clone nr.	Organism	Primersequenz 5'-3' Orientierung	Länge in bp
MaLPAAT1.1	M. alpina	atggatgaatccaccacgacca tcagcccgatgttgcgtgc	1254
MaLPAAT1.2	M. alpina	atgaaccctatctacaagggt tcagcccgatgttgcgtgc	1170
ShLPAAT	S. hanedai	atgttactgttagcattgt ttactttgccatataagg	687
T6	Thrausto.	atgagcgcgtggacgagggc ctacaagaggtcaggtcggacgtaca	918
Pp00406404	P. patens	Atggcttgatgtatatctg ttacacgattttcttttag	714
Pp02006422	P. patens	atgctgatattacagcccttc ctaatgaacaggaagaccgt	657
Pp01505214	P. patens	atgatccggatttcagag tcagtcgtttggcgaggt	444
Pp00403422	P. patens	atgccgtcgctgttcgg tcaatcagttcgccctgcttc	1305
Pp00410427	P. patens	atgctgatattacagcccttc ctaatgaacaggaagaccgt	1566
Pp02001815	P. patens	atgaccagcacggaaaatac ctagatgttagttcactc	1560
Pp01503434	P. patens	atgattatgtatggagggtgctg tcagtcgtttggcgagg	1014
Pp01503336	P. patens	atgtgttcaattttgtgg tttgttggaaacataagctgtt	1503
Fg003028298	Fusarium	atgggaaaagtccactttac ctatgaagtctccatcatcg	1893

Bei den PCR-Experimenten wurden die unten angegebenen Bestandteile eines PCR-Standardansatzes auf Eis in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, in den Thermoblock gestellt und das unten dargestellte Temperaturprofil gestartet. Als Polymerase wurde

5 in fast allen Fällen die Taq-Polymerase (Gibco BRL) eingesetzt. Lediglich bei Amplifikationen im Rahmen der funktionalen Expression in *E. coli* JC201 wurde die Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet. Die Zugabe der Polymerase erfolgte bei allen Experimenten über einen sogenannten "Heißstart", bei dem das Enzym erst nach 5 min Denaturierung des DNA-Templates zugegeben wird. Die Annealingtemperaturen (T_a)

10 wurden 3-5°C unter der mittleren Schmelztemperatur T_m der Primerpaare gewählt.

PCR-Standardansatz (für Taq-Polymerase)

5 $5 \mu\text{l}$ 10 x PCR-Puffer (100 mM Tr-HCl, pH 8,3; 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl)
 1 μl dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP u. dCTP)
 1 μl Primer 1 (30 μM)
 5 1 μl Primer 2 (30 μM)
 1 U Taq-Polymerase
 50-100 ng Plasmid-DNA-Template
 mit Aqua dest. auf 50 μl auffüllen

Heißstartprogramm

10 1. Denaturierung 95°C, 5 min
 2. Heißstart 25°C, 3 min → Zugabe der Polymerase
 3. Denaturierung 94°C 30 s
 4. Annealing T_m -5°C, 30 s
 5. Polymerisation 72°C, 1 - 3 min (für 1,0 kbp ca. 60 s)
 15 6. Die Schritte 3. bis 5. wurden 25 bis 30 mal zyklisch wiederholt.
 7. Polymerisation 72°C, 5 min
 8. Termination 4°C

GSP: TCT CTT TTT CGT GCT GCT CCA GCC GAT (Are 297)

PCR-Programm: 10min. 95°C

20 1min. 95°C (40 Cycles)
 1min. 65°C
 2min. 72°C
 10min. 72°C Pause 4°C

PCR-Maschine: Biometra Trio Thermoblock

25 Zunächst PCR auf der RACE-Bank Moos mit AP1 und GSP, bei richtiger Größe PCR mit nested AP2 und GSP, positive werden in pCRII-TOPO-TA Cloning Vector für Sequenzierung kloniert.

Beispiel 14: Expression von Thraustochytrium LPAAT (ThLPAAT) in Hefe

30 Um die Funktionalität von ThLPAAT nachzuweisen, wurde in einem ersten Ansatz der kodierende Bereich der cDNA in einem Hefe-Expressionsvektor kloniert und in S. cerevisiae exprimiert. Die in der Hefe produzierte LPAAT sollte zugesetzte über Acyltransferase-Aktivität in mikrosomalen Fraktionen nachgewiesen werden.

35 Sämtliche Fest- und Flüssigmedien für Hefe wurden nach Protokollen von Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1995) hergestellt.

Die ThLPAAT-cDNA wurde über Restriktionsverdau mit HindIII/BamHI aus dem Vektor pGEM-T ausgeschnitten, in den HindIII/BamHI geschnittenen shuttle-Vektor pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert und der so entstandene Vektor pYES2-ThLPAAT in *E. coli* XL1 blue transformiert. pYES2-ThLPAAT wurde mit Hilfe der LiAc-Methode in *S. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) transformiert, wo die Expression der ThLPAAT-cDNA unter der Kontrolle des GAL1-Promotors stand.

Die Expression von ThLPAAT in *S. cerevisiae* INVSc1 erfolgte modifiziert nach Avery et al. (Appl. Environ. Microbiol., 62, 1996: 3960–3966) und Girke et al. (The Plant Journal, 5, 1998: 39–48). Um eine Starterkultur herzustellen, wurden 20 ml SD-Medium mit Glucose und Aminosäurelösung ohne Histidin mit einer Hefe-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C bei 140 rpm inkubiert. Die Zellkultur wurde zwei mal gewaschen durch Abzentrifugieren und Resuspendieren in SD-Medium ohne Supplamente und ohne Zucker. Mit den gewaschenen Zellen wurde eine Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,3 angeimpft. Die Anzucht der Hauptkultur erfolgte in 25 ml SD-Medium mit 2 % (w/v) Galaktose, Aminosäurelösung ohne Histidin, 0,02 % Linolsäure (2%ige Stammlösung in 5 % Tergitol NP40), 10 % Tergitol NP40 72 h lang bei 30°C. Die Ernte der Hauptkultur erfolgte über Zentrifugation. Das Zellpellet wurde bei -20°C eingefroren und anschließend für ca. 18 h lyophilisiert.

Nach Expression des Kontraktes pYES2-ThLPAAT in Hefe konnte kein aktives Protein gereinigt werden. Auch die subzellulären Fraktionen aus den verschiedenen transgenen Zellen zeigten keine höheren LPAAT-Aktivitäten als die entsprechenden Kontrollfraktionen.

Zur Erhöhung der Löslichkeit des exprimierten Proteins wurde ein weiteres Konstrukt pDest15-GST-ThLPAAT (pDest15-Vektor von Invitrogen) über die Gateway-Reaktion erstellt. Dazu wurden nach Herstellerangaben folgende Primer synthetisiert:

5'-Primer att1ThLPAAT:

GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGCGCGTGGACGAGGGCC

3'-Primer att2ThLPAAT:

GGGGACCCTTGTACAAGAAAGCTGGTCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTCAA-
30 GAGGTCAGGTCGGACGTAC

Mit diesen Primern wurden folgende PCR-Reaktion durchgeführt:

PCR-Standardansatz (für Taq-Polymerase)

5 µl 10 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl)

1 µl dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP u. dCTP)

5 1 µl Primer 1 (30 µM)

1 µl Primer 2 (30 µM)

1 U Taq-Polymerase

50-100 ng pYES2-ThLPAAT

mit Aqua dest. auf 50 µl auffüllen

10

PCR-Programm: 2min. 95°C

1 min. 95°C (30 Cycles)

1 min. 65°C

2 min. 72°C

15 10 min. 72°C Pause 4°C

PCR-Maschine: Biometra Trio Thermoblock

Das PCR-Product wurde per Gateway-Reaktion (BP-Reaktion; Invitrogen) nach Herstellerangaben in den Vektor pDONOR221 transferiert und die Sequenz durch

20 Sequenzierung überprüft. In einem nächsten Schritt wurde die ThLPAAT-Sequenz dann durch die LR-Reaktion in den Vektor pDES15 übertragen und zur Expression in *E. coli* BL21 Zellen eingesetzt. Die ThLPAAT-Sequenz wurde entsprechend der Herstellerangaben (Invitrogen) an den offenen Leserahmen der im Plasmid codierten Glutathion-S-Transferase (GST) angehängt. Dadurch konnte ein Fusionsprotein aus 25 GST und ThLPAAT erzeugt werden.

Nach Expression unter Standardbedingungen in *E. coli* konnte exprimiertes Protein nachgewiesen werden (Fig. 21A) und dieses über eine Glutathion-Säule gereinigt werden.

30 Das gereinigte Fusionsprotein zeigte LPAAT Aktivität, wie in Fig. 21B gezeigt. Die höchste Aktivität konnte dabei für DHA-CoA (22:6) erhalten werden, was eine Nutzung dieser Acyltransferase zur Herstellung von PUFA ermöglicht.

Figur 21 A zeigt die Western-Blot-Analysen der in *E. coli* als Fusionsprotein (LPAAT-FP) mit N-terminalem GST- und C-terminalem His-tag exprimierten *Thraustochytrium*-LPAAT (Spuren E: 7 µg lösliche Proteinfaktion, Spur M: Größenstandard). Figur 21 B zeigt die Acyl-CoA-Spezifität der als GST-Fusionsprotein exprimierten *Thraustochytrium*-LPAAT in *E. coli*. Die Enzymtests wurden mit 0,4 µg löslicher Proteinfaktion in Gegenwart von 100 mM Tricine-NaOH (pH 8,2), 30 µM 1-Oleoyl-[U-¹⁴C]glycerin-3-phosphat und steigenden Konzentrationen der angegebenen Thioester ermittelt.

Beispiel 15: Expression von *Shewanella*-LPAAT

Zur Klonierung eines LPAAT-Gens aus dem prokaryotischen Organismus *Shewanella* wurde die genomische DNA aus *Shewanella hanedai* isoliert, partiell mit Sau3a verdaut und in den Vektor pUC18 ligiert. Diese genomische Bank wurde mittels PCR unter

- 5 Verwendung verschiedener Primerkombinationen auf LPAAT-Gene abgesucht. Mit dieser Methode ist es gelungen, einen 1486 bp langen Klon zu identifizieren, dessen offener Leserahmen ein 25,2 kDa LPAAT-Protein kodiert. Die ShLPAAT-Sequenz wurde gemäß Herstellerangaben in den Vektor pQE70 (Qiagen) eingebracht. Die so entstandenen Plasmid pQE70-Sh und pQE70-ShHis sowie der Leervektor pQE70
- 10 wurden in *E. coli* BL21 Zellen transformiert und bei 10 °C exprimiert (Figur 22 A). Nur bei dieser Temperatur konnte aktives Protein erhalten werden (Figur 22 B). Für die weiteren Versuche wurden dazu die Membranfraktionen verwendet. Diese Fraktion zeigten mit beiden Expressionsformen hohe Aktivität gegenüber dem Einbau von DHA-CoA (22:6-CoA). Die hohe Einbaurate gegenüber PUFA Acyl-CoA-Resten ist für die
- 15 Verwendung zur Herstellung von PUFA notwendig.

Figur 22 A: zeigt die Western-Blot-Analyse der in *E. coli* als Fusionsprotein mit C-terminalen His-tag exprimierten *Shewanella*-LPAAT. (Spur E: 7 µg Einschlusskörperfraktion, Spur F: 7 µg Membranfraktion, Spur M: Größenstandard). Figur 22 B: gibt die funktionale Expression der *Shewanella*-LPAAT in *E. coli*. Enzymtests wieder. Die

- 20 Assays wurden mit Extrakten (1 µg) aus *E. coli*, die den Leervektor (pQE70) oder ein *Shewanella*-Konstrukt ohne (pQE-Sh) bzw. mit His-Tag-Sequenz am 3'-Ende (pQE-ShHis) enthielten, in Gegenwart von 30 µM 1-Oleoyl-[U-¹⁴C]glycerin-3-phosphat und 30 µM der angegebenen Thioster durchgeführt.

Beispiel 16: Expression von *Mortierella* LPAAT (MaLPAAT, MaB4) in Hefe

- 25 Die MaLPAAT-cDNA wurde über PCR mit den angegebenen Primern MaLPAAT2.1 amplifiziert, das PCR Produkt in den Vektor pENTR-SD-D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben kloniert und in *E. coli* XL1 blue transformiert. Aus dem so entstandenen Vektor pENTR-SD-D-MaLPAAT wurde über Gateway-Reaktion nach Herstellerangaben (Invitrogen, Carlsbad, USA) das MaLPAAT Fragment in den Vektor pYES54Dest transferiert, resultierend in dem Vektor pYES52Dest-MaLPAAT. PY-ES52Dest-MaLPAAT wurde mit Hilfe der LiAc-Methode in *S. cerevisiae* INCSc1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) transformiert.
- 30

Hefezellen, die mit dem Plasmid pYES52Dest-MaLPAAT transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

- 35 Hefekolonien, die auf Minimalmedium ohne Uracil nach der Transformation wachsen konnten, wurden erneut auf Minimalmedium ohne Uracil ausgestrichen und dann auf flüssigem Minimalmedium bis zu einer OD600 von 0,8 gezogen. Aus dieser Vorkultur wurde dann die Hauptkultur inkuliert, die neben dem Minimalmedium noch 2 % (w/v) Galaktose sowie 250 µM der Fettsäuren beinhaltet. Nach 24 h Inkubation der Hauptkultur bei 30 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation (100 x g, 10 min, 20 °C)
- 40

geerntet und mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMEs) durch saure Methanolysen hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrol-ether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma).

Die Methodik ist zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218 beschrieben.

In Figur 23 sind die Ergebnisse der Fütterungsversuche mit den Hefezellen, die das Plasmid pYES52Dest-MaLPAAT (MaB4_AT) enthalten, gezeigt. In Fig. 23, A/B wurden die Hefe-Kulturen mit Linolsäure (18:2 Δ9,12) gefüttert. Im Vergleich zu der Kontroll-Kultur (Fig. 23, A) zeigten die Hefezellen mit der MaLPAAT deutlich höhere Umsetzung (4fach erhöht) von 18:2 zu γ-Linolensäure (18:3 Δ6,9,12), sowie eine 3,5fache Erhöhung der aus 18:2 elongierten Fettsäure 20:2 Δ11,14. Entsprechend konnte bei der Fütterung mit Linolensäure (18:3 Δ9,12,15) eine deutlich höhere Umsetzung zu Stearidonsäure (18:4 Δ6,9,12,15) und iso-Arachidonsäure (20:4 Δ8,11,14,17) im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden (Figur 24).

Neben dieser Aktivität konnte in beiden Fütterungsexperimenten eine verstärkte Umsetzung von 16:1 Δ9 (endogene Fettsäure in Hefe) zu cis-Vakzensäure (18:1 Δ11) beobachtet werden.

Figur 25 und Figur 26 zeigen, dass die beobachteten erhöhten Umsetzungen der Substrate durch die Desaturase und Elongase auch zu einer Erhöhung der polyunge-sättigten Fettsäuren in den Neutrallipid (Öl) führt. Nach Fütterung der Hefen mit Linol- bzw. Linolensäure wurden die Hefezellen in Chloroform:Methanol (2:1) extrahiert und auf eine Silica-Dünnschichtplatte (Machery&Nagel, Düren) aufgetragen. Die Dünnschichtplatte wurde in einer Kammer mit Chloroform-Methanol-H₂O (65:25:4) für 45 min inkubiert. Die Neutrallipide (Triacylglyceride) wandern dabei mit der Lösungs-mittelfront. Nach Ende der Inkubation wurden die Neutrallipide von der Platte abge-kratzt, mit Chloroform:Methanol extrahiert und durch Gas-Chromatographie analysiert.

Deutlich kann die Erhöhung des Umsatzes an PUFA's, die in den Gesamtextrakten beobachtet wurde, auch in den Neutrallipiden verfolgt werden. Für die Fütterung mit Linolsäure (Fig. 25 A und B) konnte eine 2fache Steigerung der Umsetzung von Linolsäure zu γ -Linolensäure (18:3 Δ 6,9,12) und eine 3fache Erhöhung des Gehalts an 5 20:2 Δ 9,12 beobachtet werden. Bei der Fütterung mit Linolensäure (Fig. 26, C und D) wurden ähnliche Werte erhalten (Umsetzung von 18:3 zu 18:4 3fach, von 18:3 zu 20:3 3fach).

Damit konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des Gehaltes an PUFA durch die MaLPAAT zu einer Erhöhung der PUFA's im Öl (Neutrallipide) der Hefen führt.

10 Beispiel 16: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet werden (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 66: 5221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der 15 cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA.

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der Napin- oder der LeB4- oder der USP-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-20 35S-Promotor verwenden. Das exprimierte Protein kann unter Verwendung eines Signalpeptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden (Kermode (1996) Crit. Rev. Plant Sci. 15: 285-423). Das Signalpeptid wird 5' im Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins zu erreichen.

25 Beispiel 17: Transformation von Agrobacterium

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann z.B. unter Verwendung des GV3101- (pMP90-) (Koncz und Schell (1986) Mol. Gen. Genet. 204: 383-396) oder 30 LBA4404- (Clontech) Agrobacterium tumefaciens-Stamms durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al. (1984) Nucl. Acids. Res. 13: 4777-4788).

Beispiel 18: Pflanzentransformation und Expression von PUFA-spezifischen Acyltransferasen in Pflanzen

35 Die Expression von LCPUFA-spezifischen Acyltransferasen in transgenen Pflanzen ist vorteilhaft, um den LCPUFA-Gehalt in diesen Pflanzen zu erhöhen. Dazu wurden die erfindungsgemäßen Acyltransferase-cDNAs in binäre Vektoren kloniert und über Agrobacterium-vermittelten DNA-Transfer in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus* und *Linum usitatissimum* übertragen. Die Expression der Acyltrans-

ferase cDNA stand dabei unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35 S-Promotors bzw. des samenspezifischen USP-Promotors.

5 Besonders bevorzugt sind hierbei transgene Pflanzen, die bereits die für Synthese von LCPUFAs notwendigen Desaturasen und Elongasen exprimieren und geringe Mengen dieser LCPUFAs herstellen.

10 Als Expressionsvektoren wurden der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science, 66, 1990: 221 - 230) bzw. das pBinAR Derivat pBinAR-USP, bei dem der CaMV 35 S-Promotor gegen den USP-Promotor aus *V. faba* ausgetauscht war, verwendet. Ebenfalls verwendet wurden die Vektoren pGPTV und pGPTV-USP. Zur Umklonierung mußte die CalDes-cDNA aus dem Vektor pGEM-T ausgeschnitten und in pBinAR bzw. pBinAR-USP kloniert werden. Ein weiterer verwendeter binärer Vektor war pSUN.

15 Die entstandenen binären Vektoren mit Acyltransferasegenen wurden in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert (Höfgen und Willmitzer, Nucl. Acids Res., 16, 1988: 9877). Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte mittels "floral dip" (Clough und Bent, Plant Journal, 16, 1998: 735 - 743), die von *N. tabacum* über Cokultivierung von Tabakblattstückchen mit transformierten *A. tumefaciens* Zellen, die von Lein und Raps durch Cokultivierung von Hypokotylstücken mit transformierten *A. tumefaciens* Zellen.

20 20 Die Expression der Acyltransferase-Gene in transgenen *Arabidopsis*-, Tabak-, Raps- und Leinpflanzen wurde über Northern-Blot Analyse untersucht. Ausgewählte Pflanzen wurden auf ihren Gehalt an Punicinsäure bzw. anderen konjugierten Fettsäuren wie CLA im Samenöl untersucht.

Analog zum USP-Promotor kann auch der Napin-Promotor verwendet werden, um eine samenspezifische Expression von PuFADX und PuFAD12 zu erreichen.

25 25 Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann unter Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerationstechniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B. Raton: CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

30 30 Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyltransformation transformiert werden (Moloney et al., Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Block et al., Plant Physiol. 91 (1989) 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacteriumstamm ab. Die Rapsselektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt. Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) läßt sich unter

Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13: 282-285 beschriebenen Technik durchführen.

Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-O 0424047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-O 0397687,

5 US 5,376,543, us 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden. Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

10 Beispiel 19: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus wurde auf der Transkriptions- und/oder der Translationsebene gemessen.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-BLOTS wie unten ausgeführt (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil) wobei ein Primer, der so gestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung

20 (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so dass, wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen anzeigen. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R., et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.

Northern-Hybridisierung:

30 Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit einer Stärke von 1,25% unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Arnasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N⁺, Amersham, Braunschweig) übertragen, 35 mittels UV-Licht immobilisiert und 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10% Dextranulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1% SDS, 100 mg Herring-sperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von alpha-32P-dCTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die 40 Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei

68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschriften wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 X SSC, 1 % SDS, bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 4 Stunden bis zu 3 Tagen durchgeführt.

5 Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamtproteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer

10 Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

15 Beispiel 20: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt

20 werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie,

25 Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III:

30 "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological

35 Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22) :12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, 5 William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) -16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

10 Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, 15 Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsg., 20 IRL Press, 10 S. 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

25 Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl. : Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von 35

Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, 40 WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen.

105

Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Bei Fettsäuren, für die keine Standards verfügbar sind, muss die Identität über

5 Derivatisierung und anschließende GC-MS-Analyse gezeigt werden. Beispielsweise muss die Lokalisierung von Fettsäuren mit Dreifachbindung über GC-MS nach Derivatisierung mit 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998, siehe oben) gezeigt werden.

Äquivalente

10 Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst sein.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in einem Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte umfasst:

5 a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 dargestellten Sequenz, die für ein Polypeptid mit einer Lysophosphatid-
10 säure Acyltransferase-Aktivität codiert; oder

b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus mit der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Sequenz, die für ein Polypeptid mit einer Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität codiert; oder

15 c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus mit der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 dargestellten Sequenz, die für ein Polypeptid mit einer Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität codiert; oder

d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus mit der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Sequenz, die für ein Polypeptid mit einer Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität codiert; oder
20

e) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lässt, oder
25

f) Einbringen mindestens eines Derivates der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10,
30

35

SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19,
 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27,
 SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 -
 oder SEQ ID NO: 37 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und
 5 mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2,
 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12,
 SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21,
 SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29,
 10 SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37
 aufweisen und eine äquivalente Lysophosphatidsäure Acyltransferase-
 Aktivität, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität, Diacylglycerin
 Acyltransferase-Aktivität oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität
 aufweisen, und

g) kultivieren und ernten des Organismus.

15 2. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu den unter (a) bis (f) genannten
 Nukleinsäuresequenzen weitere Nukleinsäuresequenzen in den Organismus
 eingebracht wurden, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels
 20 ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl
 carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-
 Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-
 Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n),
 Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-
 25 Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-
 Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) codieren.

3. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach Anspruch 1
 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu den unter (a) bis (f) genann-
 ten Nukleinsäuresequenzen weitere Nukleinsäuresequenzen in den Organismus
 eingebracht wurden, die für Polypeptide codieren ausgewählt aus der Gruppe
 30 Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase, Δ-4-Desaturase, Δ-5-Desaturase,
 Δ-6-Desaturase, Δ-8-Desaturase, Δ-9-Desaturase, Δ-12-Desaturase, Δ-5-Elon-
 gase, Δ-6-Elongase oder Δ-9-Elongase.

4. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach den
 Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den hergestellten
 35 mehrfach ungesättigten Fettsäuren um C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-Fettsäuren
 handelt.

5. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach den
 Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die mehrfach ungesättigten
 40 Fettsäuren aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fett-
 säure isoliert werden.

6. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren um C₁₈-, C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Molekül handelt.
- 5 7. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass im Verfahren eine mehrfach ungesättigte Fettsäure ausgewählt aus der Gruppe Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure und Docosahexaensäure hergestellt wird.
- 10 8. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus ein Mikroorganismus, ein nicht-humanes Tier oder eine Pflanze ist.
9. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus eine transgene Pflanze ist.
- 15 10. Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die transgene Pflanze eine Ölfruchtpflanze ist.
11. Isolierte Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe:
 - 20 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 dargestellten Sequenz,
 - 25 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen
 - 30 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 oder SEQ ID NO: 20 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 oder SEQ ID NO: 21 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15,

SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 oder SEQ ID NO: 21 aufweisen und eine Lysophosphatidsäure Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

12. Isolierte Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe:

- 5 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen
- 10 c) Derivate der in SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 oder SEQ ID NO: 27 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 oder SEQ ID NO: 27 aufweisen und eine Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

15 13. Isolierte Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 oder SEQ ID NO: 32 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 oder SEQ ID NO: 33 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 oder SEQ ID NO: 33 aufweisen und eine Diacylglycerin Acyltransferase-Aktivität aufweisen.

25 14. Isolierte Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 enthaltenden codierenden Sequenz ableiten lassen

5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 36 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 37 aufweisen und eine Lecithin Cholesterin Acyl-transferase-Aktivität aufweisen.

10 15. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 11 bis 14, wobei die Sequenz aus einem Eukaryont stammt.

15 16. Aminosäuresequenz, die von einer isolierten Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 11 bis 14 codiert wird.

20 17. Genkonstrukt, enthaltend eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 11 bis 14, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.

25 18. Genkonstrukt nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl - carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n).

30 19. Genkonstrukt nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -8-Desaturase, Δ -9-Desaturase, Δ -12-Desaturase, Δ -5-Elongase, Δ -6-Elongase oder Δ -9-Elongase.

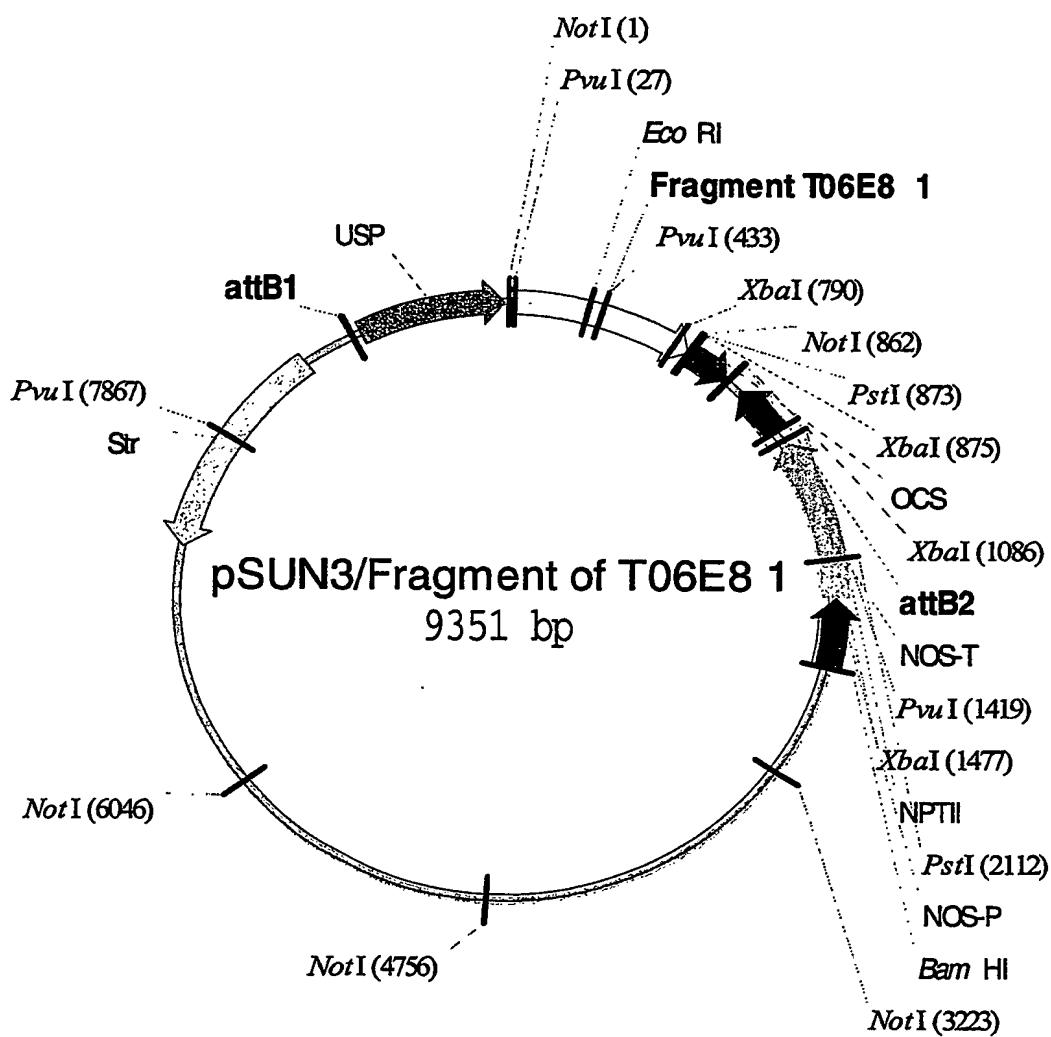
35 20. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 11 bis 14 oder ein Genkonstrukt nach den Ansprüchen 17 bis 19.

21. Transgener nicht-humaner Organismus, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 11 bis 14, ein Genkonstrukt nach den Ansprüchen 17 bis 19 oder einen Vektor nach Anspruch 20.

22. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 21, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein nicht-humaner Tier oder eine Pflanze ist.

23. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 21 oder 22, wobei der Organismus eine Pflanze ist.
24. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
- 5 25. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die mehrfach ungesättigter Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 umfasst und von transgenen Pflanzen stammt.
- 10 26. Verwendung von Öl, Lipide oder Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 25 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

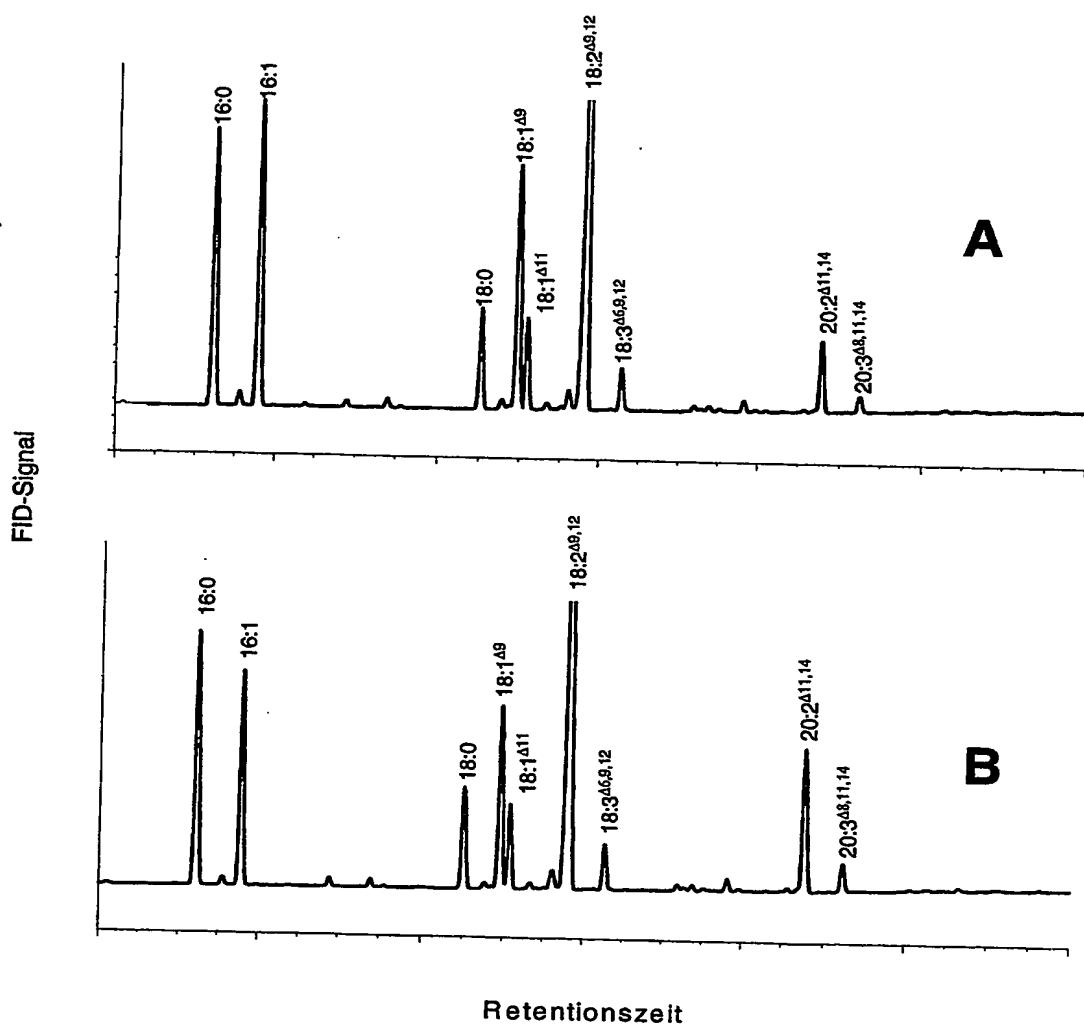
Figur 1: Vektorkarte von pSUN3CeLPLAT



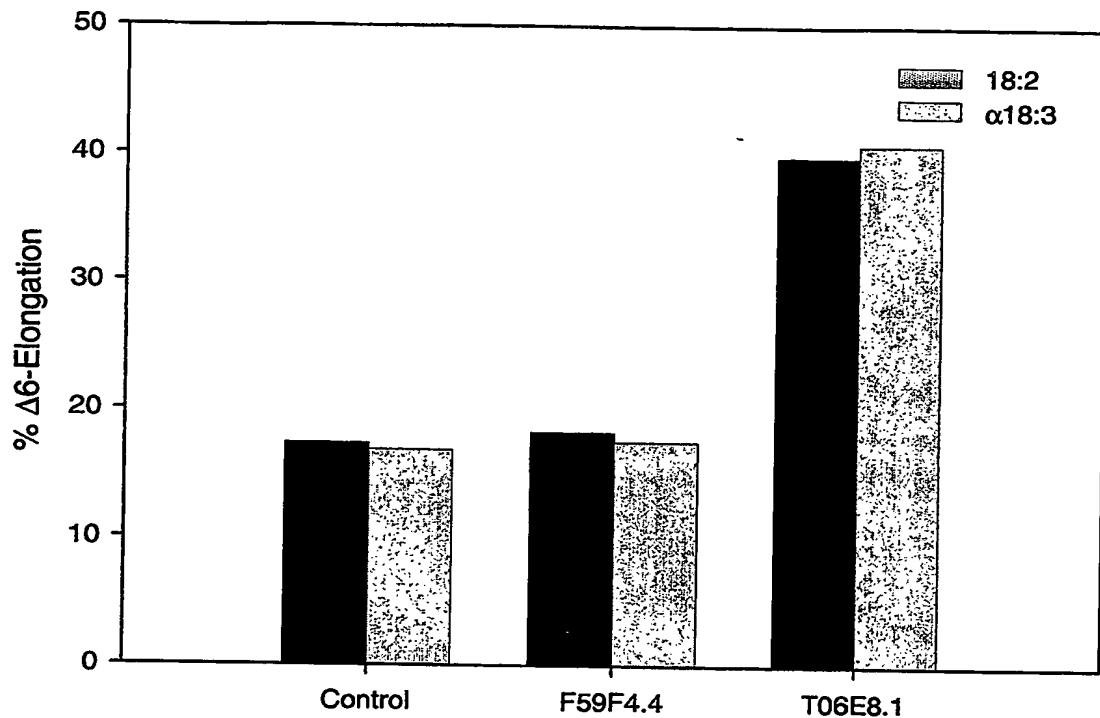
Figur 2: Aminosäure-Sequenzvergleich von *C. elegans* LPLATs (Ce-T06E8.1 und Ce-F59F4.4) mit der *M. musculus* LPAAT (Mm-NP061350).

	1	50
Mm-NP061350	MELWPGAWTA LLLLLELLI S T WFCSSSAK YFFKMAFYNG WILFLAILAI	
Ce-T06E8.1	... MENFWSI VVFFLILSILF I IYNIISTVCH Y YMRISFYFY TIELHGMEVC	
Ce-F59F4.4 MTF LAILFVIAVL I LAQLPVIG FYIRAVYFGM CLIIGGFLGG	
	51	100
Mm-NP061350	PVCAVRGRNV ENMKIILRLLL LHAKYLYGTR VEVVRGAHHFP PTQPYVVVSN	
Ce-T06E8.1	VTMIPSWLNG KGADYWFHSF FYWCKWTGWH TTIVYGYEKTO VEGPAVVION	
Ce-F59F4.4	LASIPFGKSP NNHFRMFKIF QAMTWPMGVR FEIERNSEILH DKKPYIILAN	
	101	150
Mm-NP061350	HQSSLDLGLM MEVLPDRCVP IAKRELLWAG SAGIACWLAG I IFLIDRKRTG	
Ce-T06E8.1	HQSSLDLILSM ASIWPKNCVV MMKRILAYVP FFNLGAYFSN I EEREDRYNRE	
Ce-F59F4.4	HQSALDVLGLM SFAWPVDCVV MLKSSLKYLP GFNLCAVLCDD SVYIINRFSKE	
	151	200
Mm-NP061350	DAESVMSEVA QTLLTQDVRV W W PEGTRNH NGSM PFKKG AFHIAVQAQV	
Ce-T06E8.1	RAMASVVDYCA SEMKNRNLKL W W PEGTRNR EGGFIPFKKG AFNEAVRAQI	
Ce-F59F4.4	KALKTVDTTL HEIVTKKRKV W W PEGTRNA EPELIPFKKG AFIEAKQAKI	
	201	250
Mm-NP061350	P I P I V M S S Y Q D F Y S K K E R R F T S P G R C Q V R V L P P V S T E G L T P D D V P A L A D	
Ce-T06E8.1	P I P V V F S D Y R D F Y S K P G R Y F K N D G E V V A R V L D A P T K G L T L D D V S E L S D	
Ce-F59F4.4	P I V P C V F S S H K E F Y S H A E K R L T S . G N C I E D I L P E V D S S . . K F D S I D D L S A	
	251	285
Mm-NP061350	S V R H S M L T I F R E T S T D G L G G G D C L K K P G G A G E A R L	
Ce-T06E8.1	M C R D V M L A A Y K E V T L E A Q Q R N A T R R G E T K D G K K S E	
Ce-F59F4.4	H O R K I M Q A H R E K L D A E A A N L N I	

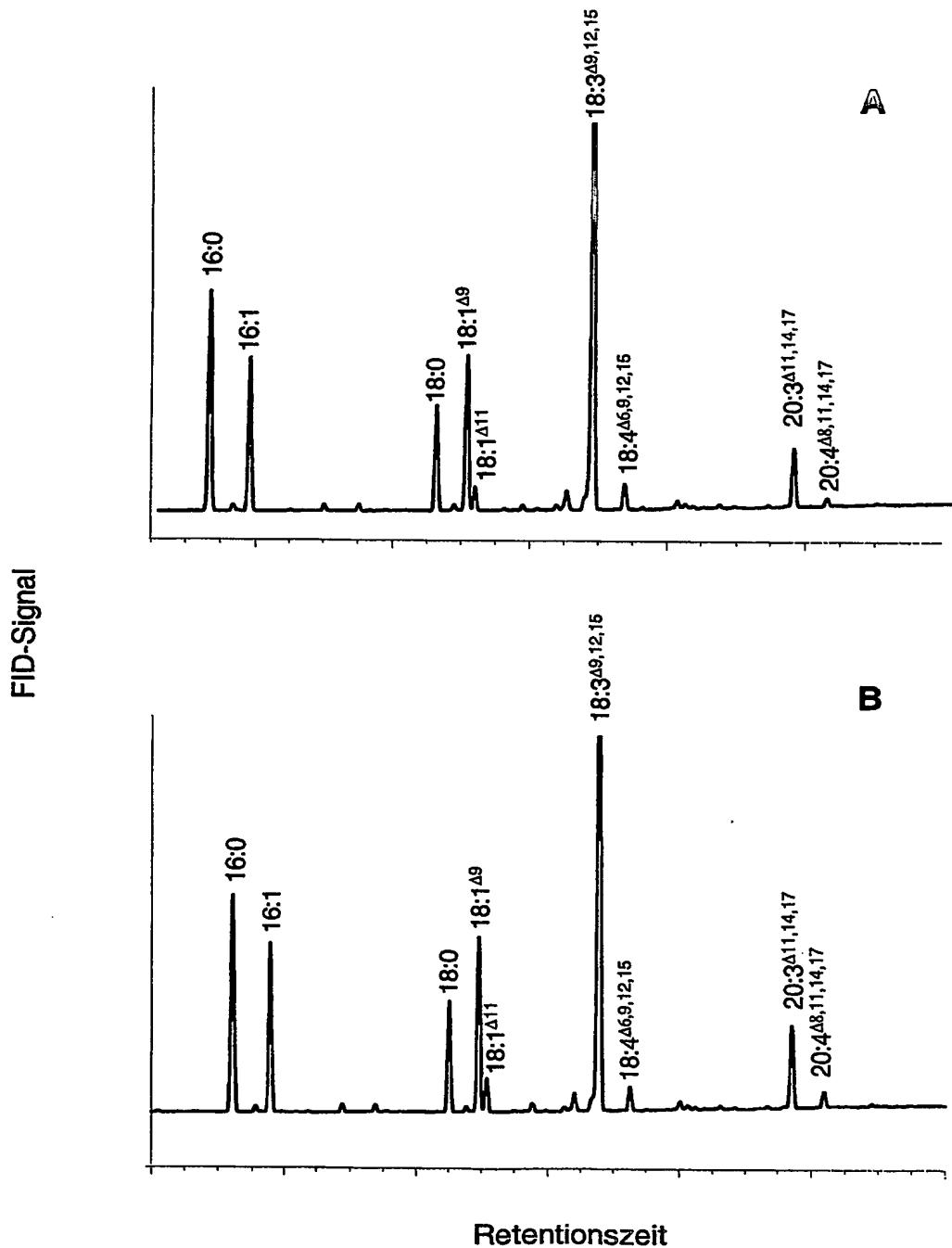
Figur 3: Fettsäureprofile von transgenen C13ABYS86 *S. cerevisiae*-Zellen



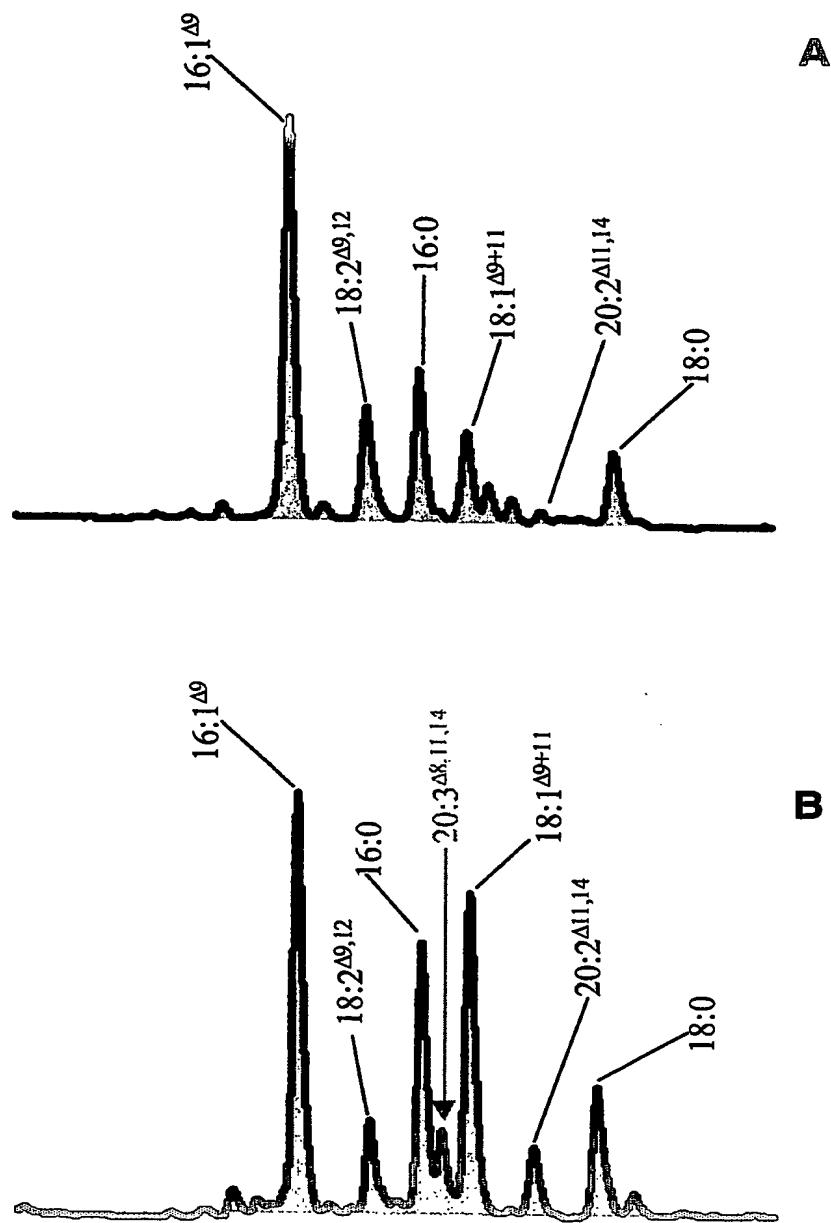
Figur 4: Elongation exogen applizierter $18:2^{\Delta 9,12}$ bzw. $18:3^{\Delta 9,12,15}$ im Anschluss an ihre endogene $\Delta 6$ -Desaturierung (Daten aus Fig. 2 und 3).

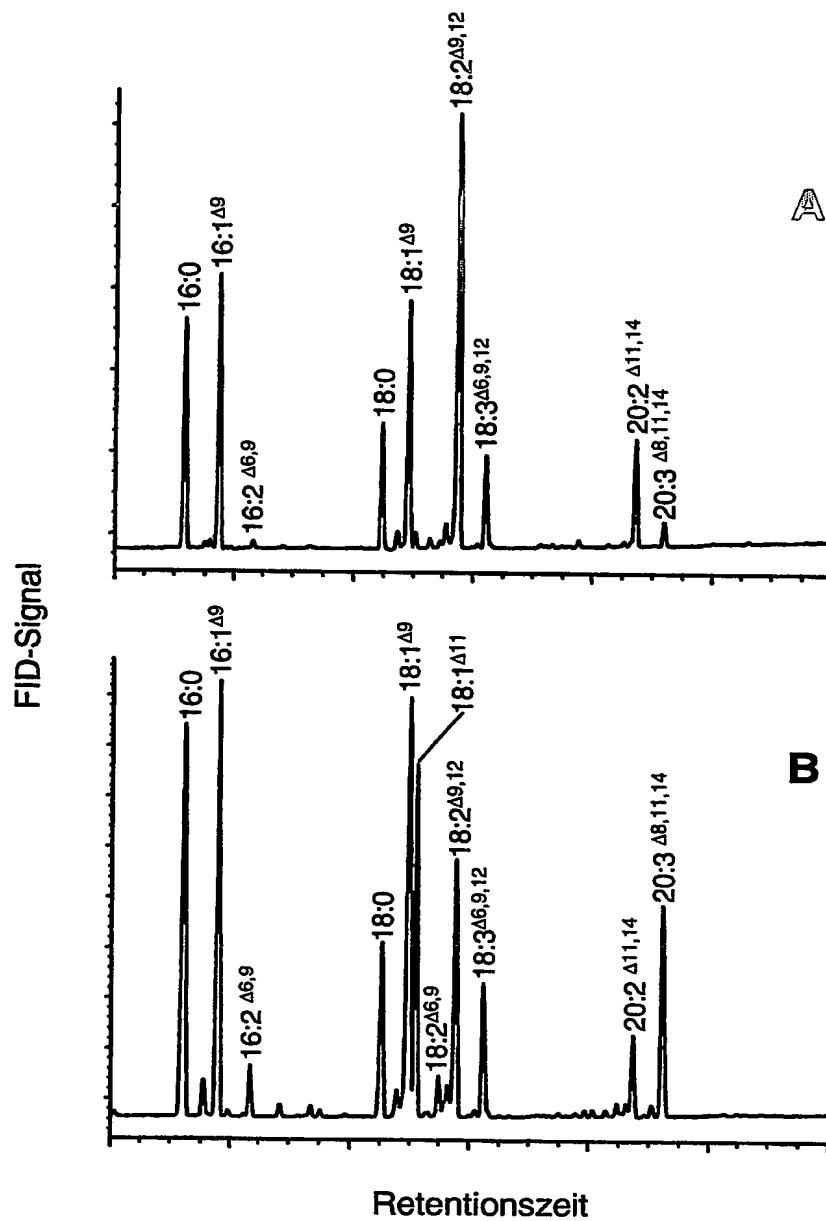


Figur 5: Fettsäureprofile von transgenen C13ABYS86 S. cerevisiae-Zellen

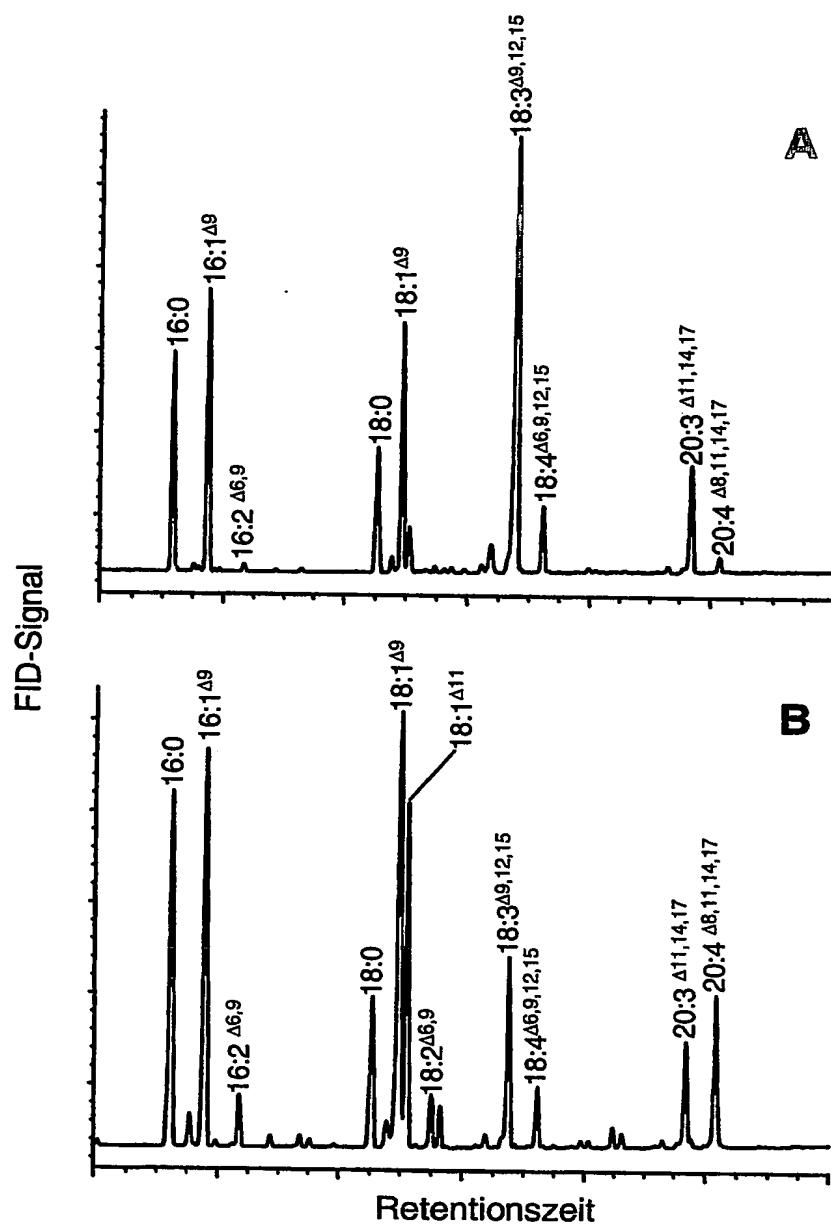


Figur 6: Acyl-CoA-Zusammensetzung transgener INVSc1 Hefen, die mit den Vektoren pESCLeu PpD6Pse1/pYes2 (A) oder pESCLeu-PpD6-Pse1/pYes2-T06E8.1 (B) transformiert worden waren.

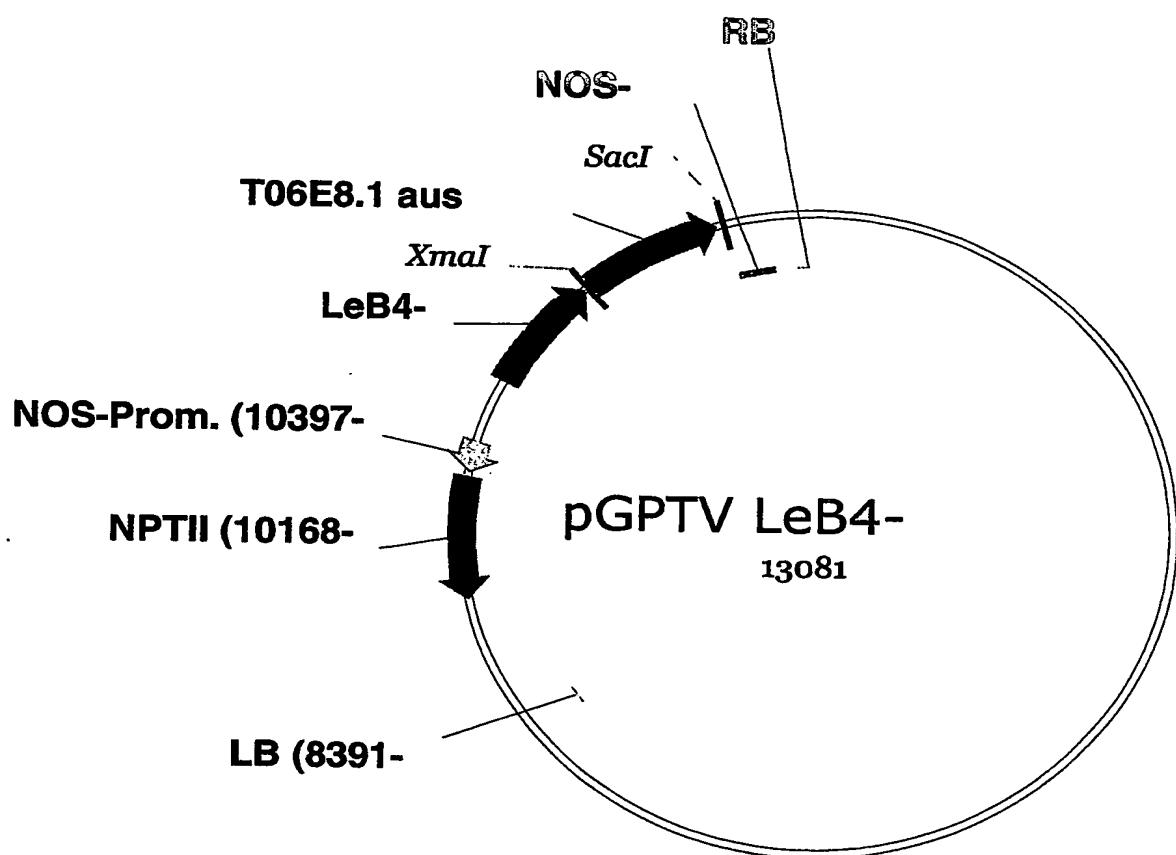


Figur 7: Fettsäure-Profile von transgenen INVSc1 *S. cerevisiae*-Zellen

Figur 8: Fettsäure-Profile von transgenen INVSc1 *S. cerevisiae*-Zellen.

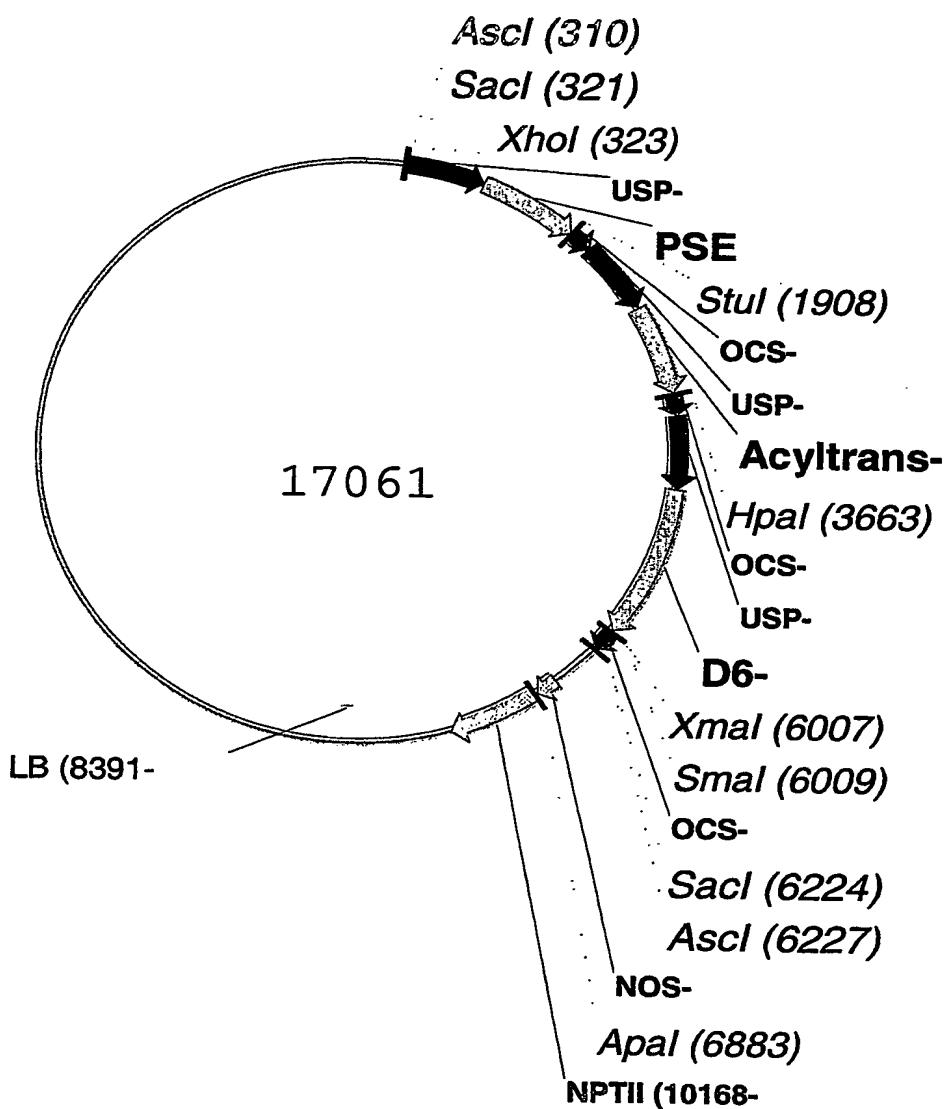


Figur 9A: Vektorkarte von pGPTV LeB4-700 + T06E8.1

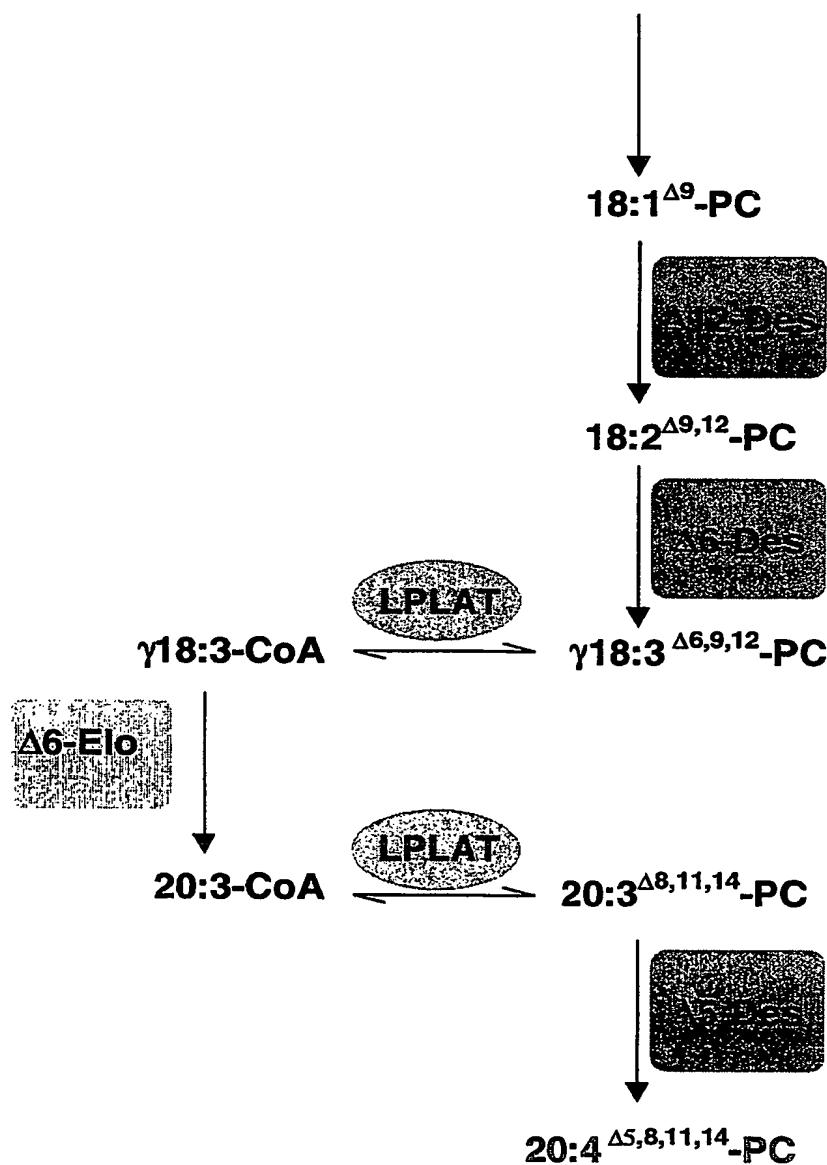


Figur 9B: Vektorkarte von pGPTV USP/OCS-1,2,3 PSE1(Pp)+D6-Des(Pt)+2AT (T06E8-1)

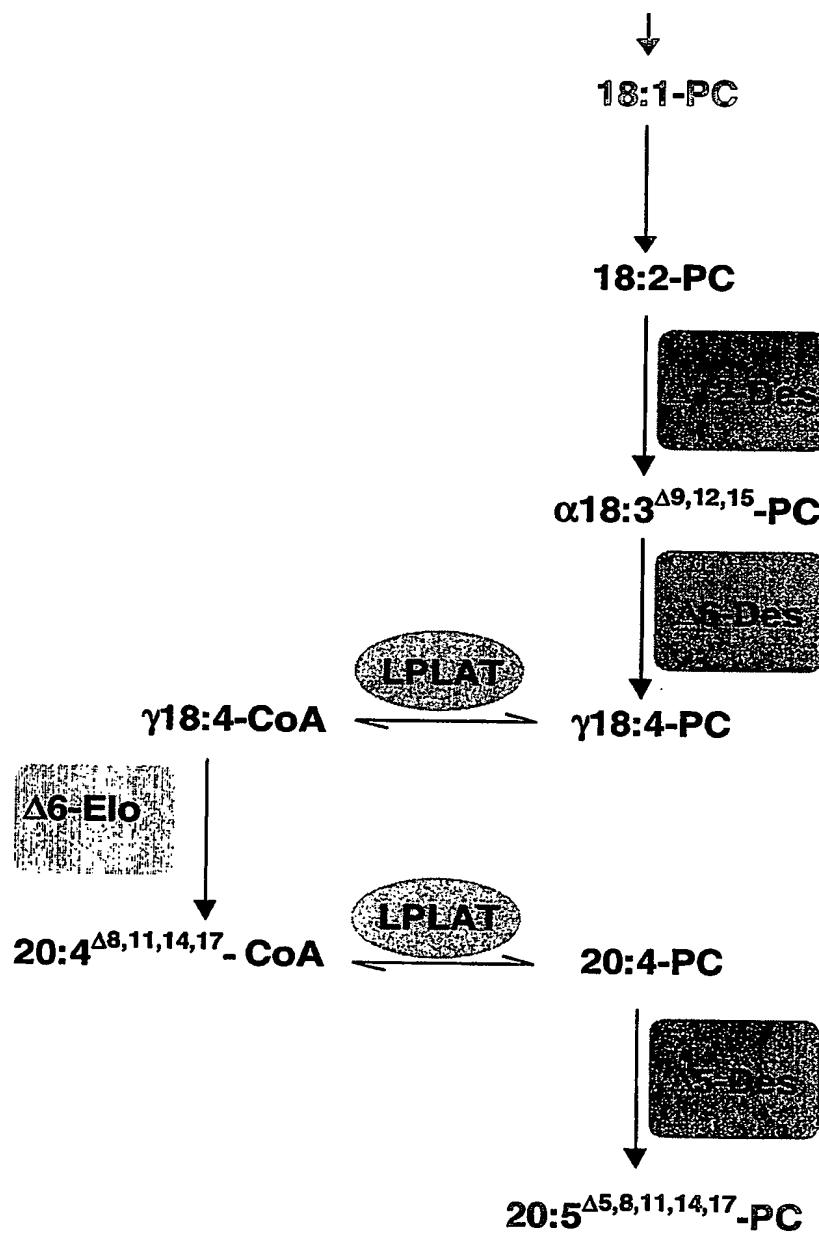
pGPTV/USP/OCS-1,2,3 PSE1(Pp) D6-Des(Pt)-2 AT(T06E8-1)



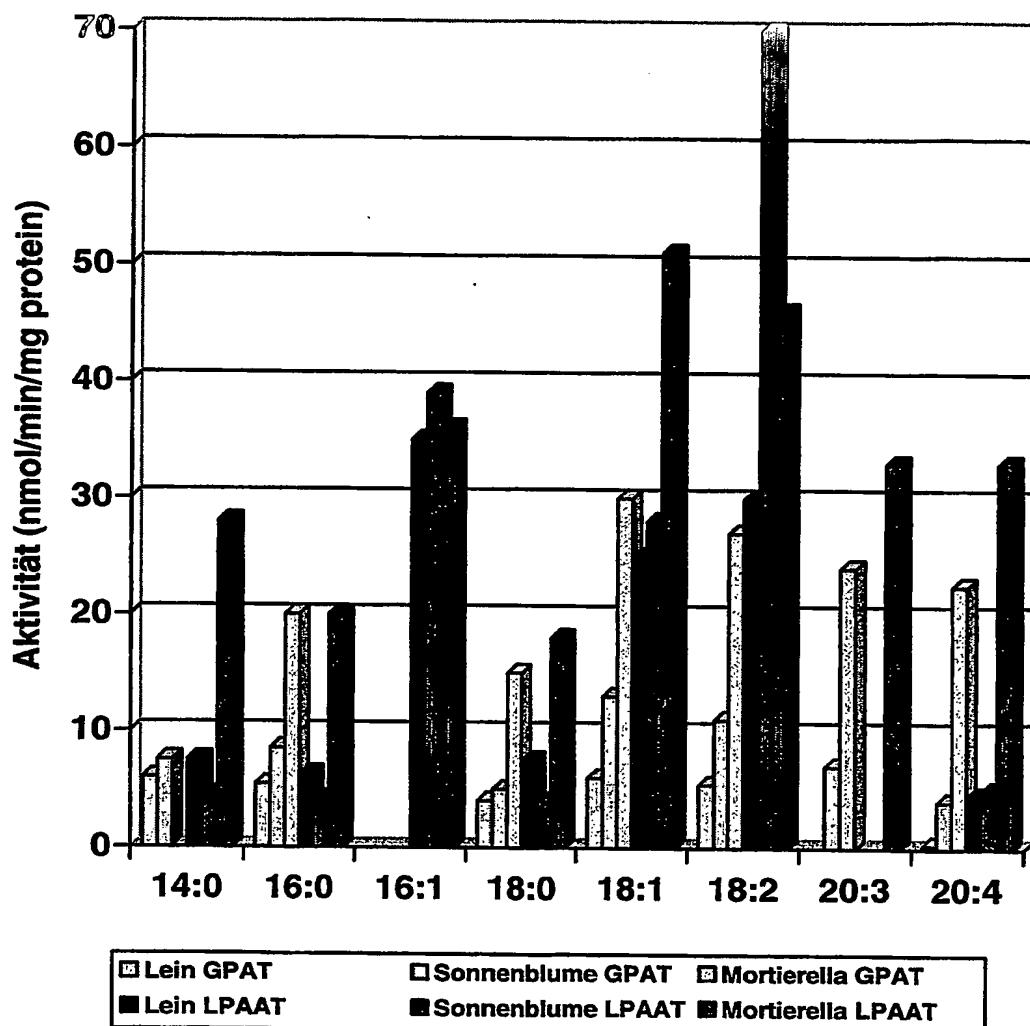
Figur 10A: Biosynthese-Weg von LCPUFAs



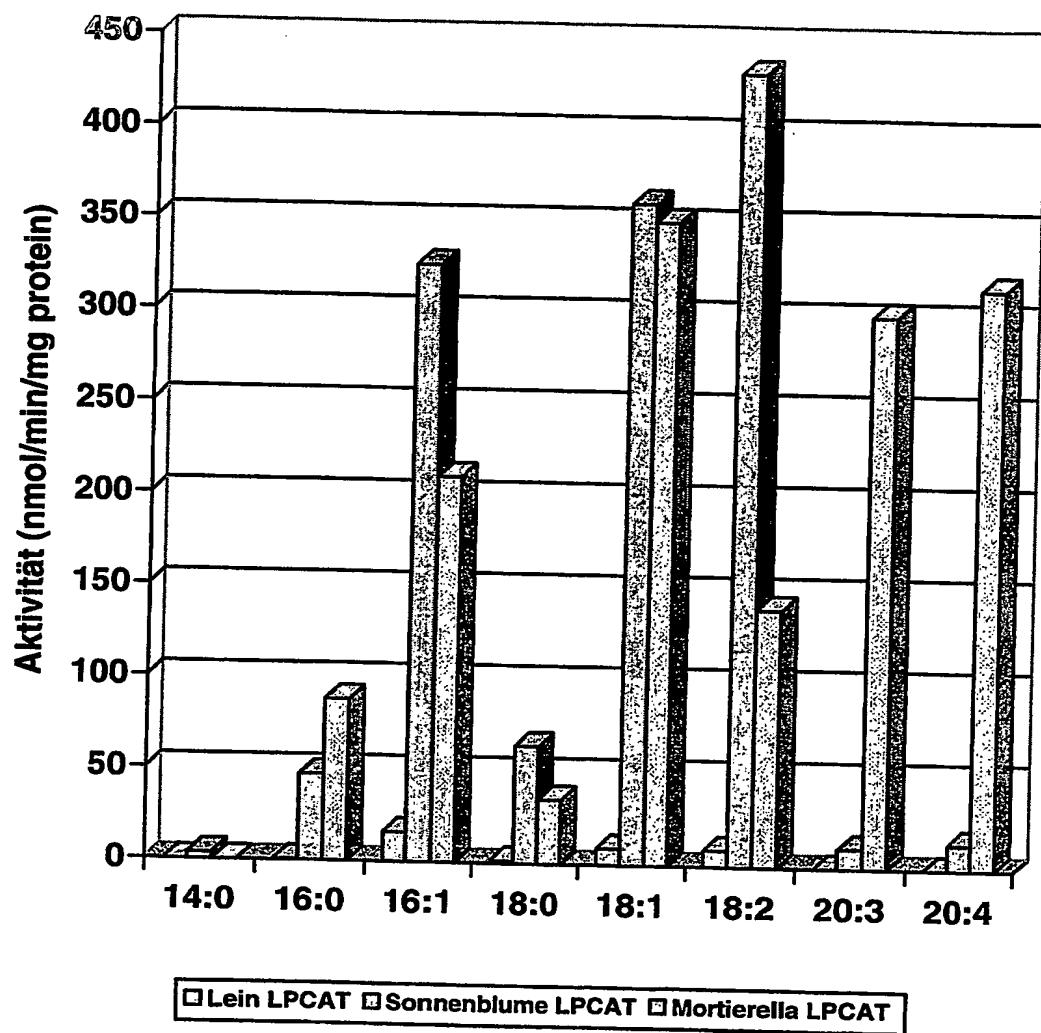
Figur 10B: Biosynthese-Weg von LCPUFAs



Figur 11: Vergleich von GPAT und LPAAT Substratspezifitäten in Lein, Sonnenblume und *Mortierella alpina*



Figur 12: Vergleich von LPCAT Substratspezifität in Lein, Sonnenblume und - *Mortierella alpina*



Figur 13: Vergleich von SEQ ID NO: 2 mit Swiss-Prot Datenbank

	1	50
Q9JZ47	MSSNKASFFTRL
Q9JU41	MSSNKASFFTRL
Q59601	MSSNKASFFTRL
Q9HW50	MARLRLLLRSARL
SEQ ID NO: 2	MSAWTRAKTAVGL
O35259	METIMDDEVTKRTSAEELESWNLLSRTNYNFQYISLRLTILWGLGVLIRY	
	51	100
Q9JZ47	RRLCRLAVWLFKTKGNLRGIDGG.CPESRNRAVIELGRGVLAALD....	
Q9JU41	RRLCRLTVWLFKTKGNLRGIDGG.CPESRNRAVIELGRGVLAALD....	
Q59601	RRLCRLTVWLFKTKGNLRGIDGG.CPKSRNRAVIALGKGALAALD....	
Q9HW50	LGLVALGLGLAAWVSLRERLPGADVTPLRQLTRWVLARLCAALP....	
SEQ ID NO: 2	LT LAPARIVFLTVLGYGLTVAACTRLGVPKSFVGLTRCVARLTLWGL	
O35259	CFLLPLRILAFATGIGLLVVGTTMVGYLPNGRFKEFLSKHVHLMCYRICV	
	101	150
Q9JZ47	..IGLEVGRPAPEHPNG..VLVAANHVSWLDFAMS.AVYPSSFIAKQEI	
Q9JU41	..IGLEVGRPAPEHPNG..VLVAANHVSWLDFAMS.AVYPSSFIAKQEI	
Q59601	..IGLEVGRPAPEHPNG..VLVAANHVSWLDFAMS.AVYPSSFIAKQEI	
Q9HW50	..FEVRVSGEAPRQP....MLWVANHVSWTIDIPLLG.ALAPLTFLSKAEV	
SEQ ID NO: 2	GFYHIEVSCDAQGLREWP.RVIVANHVSYLEILYFMSTVHCPSFVMMKTC	
O35259	RALTAAITYHNRKNRPRNGGICVANHTSRIDVIIFASDGYYAMVGQVHGG	
	151	200
Q9JZ47	KSWPVLGKMGQNAGTVFIRNSRR.....DIEPINRAVCETLQRGQ	
Q9JU41	KSWPVLGKMGQNAGTVFIRNSRR.....DIEPINRAVCETLQRGQ	
Q59601	KSWPVLGKMGQNAGTVFIRNSRR.....DIEPINRAVCETLQRGQ	
Q9HW50	RAWPLAGWLAEKAGTFLFIRRGSG.....DSRLINQRLAEQLHRGR	
SEQ ID NO: 2	LRVPLVGYIAMELGGVIVDREGGGQSASAIIRDRVQEPPRDSSSEKHHQ	
O35259	LMGVIQRAMVKACPHVWFERSEVK.....DRHLVAKRLTEHVQDKS	
	201	250
Q9JZ47	..NVSFFPEARTSSGLLPPKAALFQSAIDAGAKVLAVALRYYDETGKR	
Q9JU41	..NVSFFPEARTSSGLLPPKAALFQSAIDAGAKVLAVALRYYDETGKR	
Q59601	..NVSFFPEARTSSGLLPPKAALFQSAIDAGAKVLAVALRYYDETGKR	
Q9HW50	..NLLIFPEGTTNGESLRTFHGRIMASALEAGVAVQPVAISYRRDGVPD	
SEQ ID NO: 2	..PLLVPPEGTTNGSCLLQFKTGAFR...PG.APVLPVVLEFPIDKARG	
O35259	KLPILIFPEGTCINNTSVMMFKKGSFEIG....ATVYPVAIKY..DPQFG	

	251	300
Q9JZ47	TARPSYADVGLPTCLWRIVSMKKLTIRVDFVCVADAAE.....	
Q9JU41	TARPSYADVGLPTCLWRIVSMKKLTIKVDFVCVADAAE.....	
Q59601	TARPSYADVGLPTCLWRIVSMKKLTIKVDFVCVADAAE.....	
Q9HW50	AQAPFIGDDDLLSHLGRLLRGERGSVHSQLLEPIPSQ.....	
SEQ ID NO: 2	DFSPAYESVHTPAHLLRMLAQWRHRLRVRYLPLYEPSAAEKVDADLYARN	
O35259	DAFWNSSSKYGMVTYLLRMMTSWAIVCSVWYLPPTRE.....	
	301	349
Q9JZ47	...SEDRYALKDKIEESIRAVVADDADIAV.....	
Q9JU41	...SEDRYALKDKIEESIRAVVADDADIAV.....	
Q59601	...SEDRYALKDKIEESIRAVVADDADIAV.....	
Q9HW50	...GLDRAELARQAQQAVRLALFGTAAPTQTRRAA.....	
SEQ ID NO: 2	VRDEMARALKVPTVEQSYRDKLVYHADIMPHYQKAGPGALYLYVRPDLL	
O35259KDEDAVQFANRVKSAIARQEDW.....	

Figur 14: Vergleich von SEQ ID NO: 5 mit Swiss-Prot Datenbank

	1	50
Q9C9P8	MEVCGDLKSDNLKNRPLTPLRILRGLMILLVFLSTAFMFLLYFAPIAALG	
Q9SFJ1	MEVCGDLKSDNLKNRPLTPLRILRGLMILLVFLSTAFMFLLYFAPIAALG	
Q9LHN4MEKKSVPSDKLSSLIRVLRGIICLMLVSTAFMMLIFWGFLSAVV	
SEQ ID NO: 5	
Q9SDN3	
Q9XFW4MAMAAAIVPLGILFFISGLVVNLLQAVCYVLV	
	51	100
Q9C9P8	LRLLSVQQSRKVVSЛИFGLWLALWPYLFETVNGTTVVFSGDIIP...VEK	
Q9SFJ1	LRLLSVQQSRKVVSЛИFGLWLALWPYLFETVNGTTVVFSGDIIP...VEK	
Q9LHN4	LRLFSIRYSRKCVSFFFGSWLALWPFLFEKINKTKVIFSGDKVP...CED	
SEQ ID NO: 5MDVVKVIFAGDKVP...KEN	
Q9SDN3MGKE	
Q9XFW4	RPMSKNTYRKINRVVAETLWLELVWIVDWWAGVKIQVFADDETNRMGKE	
	101	150
Q9C9P8	RVLLIANHRTEVDWMLWNIALRKGC ^L GYIKYVLKSSL ^M KLP ^I FGWG ^F HV	
Q9SFJ1	RVLLIANHRTEVDWMLWNIALRKGC ^L GYIKYVLKSSL ^M KLP ^I FGWG ^F HV	
Q9LHN4	RVLLIANHRTEVDWMLWNIALRKGC ^L GYIKYVLKSSL ^M KLP ^I FGWG ^F HV	
SEQ ID NO: 5	RVMVMCNHRTEVDWMLWNIALRKGC ^L GYIKYVLKSSL ^M KLP ^I FGWG ^F HV	
Q9SDN3	HALVISNHRSDIDWLGVWVLAQRSGCLGSSLAVMKSSKFLPVIGWSMWF	
Q9XFW4	HALVVCNHRSDIDWLGVWVLAQRSGCLGSSLAVMKSSKFLPVIGWSMWF	
	151	200
Q9C9P8	LEFIPVERKREVDEPVLLQMLSSFKDPQEPLWLALFPEGTDFTEEKCKRS	
Q9SFJ1	LEFIPVERKREVDEPVLLQMLSSFKDPQEPLWLALFPEGTDFTEEKCKRS	
Q9LHN4	FEFIPVERRWEVDEANLRQIVSSFKDPRDALWLALFPEGTDFSEAKRTG	
SEQ ID NO: 5	FEFLMLHRKWEVDAPVIKTYIDSFQDKRDPLWLVVFPEGTDFSEAKRTG	
Q9SDN3	SEYLFLERSWAKDEGTLKSGVQRLKDFPQPFWLALFVEGTRFTQAKLLAA	
Q9XFW4	SEYLFLERNWAKDESTLQSGLQRLNDPFPFWLALFVEGTRFTEAKLKAA	
	201	250
Q9C9P8	QKFAAEVGLPALS ^N VLLPKTRGFGV ^C LEV ^L HNSLDAVYDLTIAYKPRCP.	
Q9SFJ1	QKFAAEVGLPALS ^N VLLPKTRGFGV ^C LEV ^L HNSLDAVYDLTIAYKPRCP.	
Q9LHN4	KKFAAE ^N GLPILNNVLLPRTKGFV ^S CLQELSCS ^L DAVYDVTIGYKTRCP.	
SEQ ID NO: 5	NAIGREKG ^P ELVNVLQPRTRGFVTCLS ^Q SRCS ^L DAVYDLTIAYKPRCP.	
Q9SDN3	QEYAAATGLP ^V PRNVLI ^P RTKGFVTAVSQMRSFAPAIYDVTVAIPKSSPA	
Q9XFW4	QEYAAASSEL ^P VPRNVLI ^P RTKGFVSAVS ^N MRSFVPAIYDMTVAIPKTSPP	

	251	
Q9C9P8	SFMDNVFGTDPSEVHIHVRVLLKEIPANEAEssaLMDSFKLKDKLSD	
Q9SFJ1	SFMDNVFGTDPSEVHIHVRVLLKEIPANEAEssaLMDSFKLKDKLSD	
Q9LHN4	SFLDNVYGIEPSEVHIHIRRINLTQIPNQEKDINAFLMNTFQLKDQLLND	
SEQ ID NO: 5	LFINNVFGTDPSEVHIHIRRIPISEIPQSEDGMTQWLYDLFYQKDQMLAS	
Q9SDN3	PTMLRLFEGRPSVHVHIKRHVMRDLPETDEAVAQWCKDIFVAKDALLDK	
Q9XFW4	PTMLRLFKGQPSVHVHIKCHSMKDLPEPEDEIAQWCRDQFVAKDALLDK	
	301	350
Q9C9P8	FNAQGKFPNQRPEEEELSVLKCIAFAGKQQQVTKPSCQKVFLNNQSSDE	
Q9SFJ1	FNAQGKFPNQRPEEEELSVLKCIAFAGKQQQVTKPSCQKVFLNNQSSDE	
Q9LHN4	FYSNGHFPNEGTEKEFNTKKYLINCLAVIAFTTICHTLTFSSMIWFRIY	
SEQ ID NO: 5	FSKTGSFPDSGIE..ESPLNIVEGVCNVALHVVLSGWVFWCLFHGVWLKY	
Q9SDN3	HTVEQTFGDQQLKVTGRPLKSLVVTAWACLLILGALKFLYWSLLSSWK	
Q9XFW4	HIAADTFPGQKEQNIGRPIKSLAVVVSWACLLTLGAMKFLHWSNLFSSWK	
	351	400
Q9C9P8	KESKKAVAQHPFTDTLDHLFQVEHSISCFLYMHIYNLSTCHLISLYE...	
Q9SFJ1	KESKKAVAQHPFTDTLDHLFQVEHSISCFLYMHIYNLSTCHLISLYE...	
Q9LHN4	VSLACVYLTSAHFNLRSVPLVETAKNSLKLVNK.....	
SEQ ID NO: 5	VAFA SILLAFSTYFDWRPKPVYSSLRTKRKIV.....	
Q9SDN3	GIAFSALGLGVVTVLMQILIRFSQSERSTPAVAPVAPTNNKNKGESSGKPEK	
Q9XFW4	GIALSAFGLGIITLCMQILIRSSQSERSTPAKVAPAKPKDNHQSGPSSQT	
	401	
Q9C9P8	
Q9SFJ1	
Q9LHN4	
SEQ ID NO: 5	
Q9SDN3	QQ.....	
Q9XFW4	EVEEKQK	

Figur 15: Vergleich von SEQ ID NO: 35 mit Swiss-Prot Datenbank

P04180	1	50
Q08758MGP
Q9MZ04MGP
Q9DDJ6MGL
Q9Y2B3MGR
SEQ ID NO: 35	MCSISCGSTPQQQLCHYRKSGELITRKSRAAIRWWRYGQQCKVLLPLDLIR	
P04180	51	100
Q08758	PGSPWQWVTLLLGLLLPP.....AAPFWLLNVLFPPHTTPK
Q9MZ04	PGSPWQWVPLLLGLLLPP.....AAPFWLLNVLFPPHTTPK
Q9DDJ6	PGSPWQWVLLLLELLLPT.....AAPFWLLNVLFPPHTTPK
Q9Y2B3	TGAGFALLTLLLLLPQP.....ASQFWLFNVLFPPPTSTPE
SEQ ID NO: 35	HLRPYRVGLLPDGLLFLL.....LLMILLADPALP.....	
P04180	101	150
Q08758	AELSNHTRPVILVPGCLGNQLEAKLDKPDVVN.WMCYRKTEDFTIWL	DL
Q9MZ04	AELSNHTRPVILVPGCLGNQLEAKLDKPDVVN.WMCYRKTEDFTIWL	DL
Q9DDJ6	AELSNHTRPVILVPGCLGNQLEAKLDKPDVVN.WMCYRKTEDFTIWL	DL
Q9Y2B3	APPTNSTPPVVLVPGCLGNQLEAKLDKPDVVN.WMCYRKTEDYFTIWL	NL
SEQ ID NO: 35	...AGRHPPVVLVPGDLGNQLEAKLDKPTVVA.YLCSKKTESYFTIWL	
P04180	151	200
Q08758	NMFLPLGVDCWIDNTRVVYNRSSGLVSNAPGVQIRVPGFGKTYSVEY	LDS
Q9MZ04	NMFLPLGVDCWIDNTRVVYNRSSGLVSNAPGVQIRVPGFGKTYSVEY	LDS
Q9DDJ6	NMFLPLGVDCWIDNTRVVYNRSSGRVSNAPGVQIRVPGFGKTYPVEY	LDN
Q9Y2B3	NTFLPVGVDCWIDNTRVVYNRTSRKMSNAPGVHIRVPGFGKTYSVEY	LDQ
SEQ ID NO: 35	LDP	
P04180	201	250
Q08758	SK..LAGYLHTLVQNLVNNNGYVRDETVRAAPYDWRLEPGQQE.....	EYY
Q9MZ04	SK..LAGYLHTLVQNLVNNNGYVRDETVRAAPYDWRLEPGQQE.....	EYY
Q9DDJ6	SK..LAGYMHTLVQNLVNNNGYVRDETVRAAPYDWRWLGPQQE.....	EYY
Q9Y2B3	SK..LAGYLHTLVQNLVNNNGYVRDETVRAAPYDWRVGPQQE.....	EYF
SEQ ID NO: 35	SKSSVGSYFHTMVESLGVWGYTRGEDVRGAPYDWRRAPNENG.....PYF	
P04180	SLKFLTGMIHLVNAALKGYENGKSLYGAPYDFRFAPGPHASNV	
Q08758	AYEYL	
Q9MZ04		
Q9DDJ6		
Q9Y2B3		
SEQ ID NO: 35		

	251	
P04180	RKLAGLVEEMHAAYG.KPVFLIGHSLGCLHLLYFLLRQPQAWKDRFIDGF	300
Q08758	HKLAGLVEEMHAAYG.KPVFLIGHSLGCLHLLYFLLRQPQAWKDRFIDGF	
Q9MZ04	RDLARLVEEMHATYG.KPVFLIGHSLGCLHLLHFLHQPQSWKDRFIDGF	
Q9DDJ6	QNLKALIEEMHDEYQ.QRVFLIAHSMGNLNVLYFLLQQRQAWKDQYIGGF	
Q9Y2B3	LALREMIEEMYQLYG.GPVVLAHSMGNMYTLYFLQRQPQAWKDKYIRAF	
SEQ ID NO: 35	KDLKDLIETAYSVNANEPVVILAHSMGGLWTLFILNQQSMEWRNKYVSRF	
	301	350
P04180	ISLGAPWGGSIKPMVLVLAGDNQGIPIMSSIKLKEEQRITTTSPWMFPSR	
Q08758	ISLGAPWGGSIKPMVLVLAGDNQGIPIMSSIKLKEEQRITTTSPWMFPSR	
Q9MZ04	ISLGAPWGGSIKPMQVLVLAGDNQGIPIMSSIKLKEEQRITTTSPWMFPSR	
Q9DDJ6	ISLGAPWGGSVKPLRVLVLAGDNQGIPIMSSIKLKEEQRITTTSPWMFPSR	
Q9Y2B3	VSLGAPWGGVAKTLRVLAGDNRRIPVIGPLKIREQQRSAVSTSWLLPYN	
SEQ ID NO: 35	VSVATPWGGAQEQQMMTFASGNPEGVPFVNSLVRREEQRRSESNLWLLPVR	
	351	400
P04180	MAWPEDHVFISTPSFNYTGRDFQRFFADLHFEEGWYMWLQ.SRDLLAGLP	
Q08758	LAWPEDHVFISTPSFNYTGRDFQRFFADLHFEEGWYMWLQ.SRDLLAGLP	
Q9MZ04	EVWPEDHVFISTPSFNYTIRDYQRFVDFHFEEGWYMWLQ.SRDLLAGLP	
Q9DDJ6	LAWPEDHIFISTPSFNYTYRDYKQFFTVDNLEDGWMWED.MKDLLKGLP	
Q9Y2B3	YTWSPEKVFVQTPTINYTLRDYRKFFQDIGFEDGWLMRQD.TEGLVEATM	
SEQ ID NO: 35	RCFR.DRPLVITSSRNYTAGDMEQFLCDIGFPEGVAPYKSRIPLHLDILO	
	401	450
P04180	APGVVEVYCLYGVGLPTPRTYIYDHGFPYTDPGVVLVEDGDDTVATRST.E	
Q08758	APGVVEVYCLYGVGLPTPRTYIYDHGFPYTDGVVLVEDGDDTVATRST.E	
Q9MZ04	APGVVEVYCLYGVGLPTPSTYIYDHDFPYTDPLDVLYEDGDNNTVATRSM.E	
Q9DDJ6	PPGVDTYCLYGTGYPVTETYIYDEHFPYEDPVDIMIYGDGDDTVNRRSS.E	
Q9Y2B3	PPGVQLHCLYGTGVPTPDSFYES.FPDRDPK.ICFGDGDTVNLKSA.L	
SEQ ID NO: 35	PPQVPVTLIHINGYGVPTAETLSYK.KGFDNHPEITEGDGDGTNVNCSLTA	
	451	500
P04180	LCGLWQGRQPQPVHLLPLHGIQHLMVFSNLTLHINAILLGAYRQGPPA	
Q08758	LCGLWQGRQPQPVHLLPLRGIQHLMVFSNLTLHINAILLGAYRQGPPA	
Q9MZ04	LCSQWQGRQPQPVHLLPLHRIQHLMVFSNLTLHINAILLGAYRQGPPA	
Q9DDJ6	LCKRWRNQQKQKVHIIQELRGIDHLMVFSNLTLSSINEILLGSSQVGAGT	
Q9Y2B3	QCQAWQSRQEHQVLLQELPGSHIEMLANATTLAYLKRVLLGP.....	
SEQ ID NO: 35	VVEEWERVAGQELEMIALHGKQHMQILHDDHSVQVIVDAILNVTPQEQLM	
	501	524
P04180	SPTASPEPPPPE.....	
Q08758	SLTASPEPPPPE.....	
Q9MZ04	PPAASPRPLTPE.....	
Q9DDJ6	KEHGELGQMGALKSSLEAGRRGKN	
Q9Y2B3	
SEQ ID NO: 35	FH.....	

Figur 16: Vergleich von SEQ ID NO: 23 mit Swiss-Prot Datenbank

	1		50
P10349		
Q9FEP9MFILSSSSSTLPSAPPFSSTSIFLSFSRVSLPPSSSSLK...		
Q39639	MFILSAVSSSSSSSSVPSSLPPSISLSFSRVSLPPSSSSSSL		
Q9FEQ0MFILSSSSSLPSPLSLSSSRVSLPPPSSSSLN..		
Q9M4V1MLVPSALPRVSRVSVAARFSVSGVGSSPALSSRS		
SEQ ID NO: 23MPSLFRAKRNGRRTPGNAVTN...		
	51		100
P10349	MAELIQDKESAQSAATAAAAS	
Q9FEP9	..LLPLSLQFGPPKLAS.	SCSLRFSASRAMAELIQDKESAQSAATAAAAS	
Q39639	KLFLPLSLHFTPPLSFLSSPHSFLRFSASRAMAELIQDKESAQSAATAAAAS		
Q9FEQ0	..LLPLSPHFQPPNLAC...	SCSVASRSTAELLHDFKHSAGTAASADEAR	
Q9M4V1	CTSLDSSVRSSLRCPCGIYTSRTKAVVEAVESKASAREWRSAVKRAVLA		
SEQ ID NO: 23FGKSEFH.....R..EIS...	GSTRATTQVAEATTAGLRE	
	101		150
P10349	SGYERRNEPAHSRKFLDVRSEEELLSCIKKETEAGKLPPNVAAGMEELYQ		
Q9FEP9	SGYERRNEPAHSRKFLDVRSEEELLSCIKKETEAGKLPPNVAAGMEELYQ		
Q39639	N.....DPPHSRAFLDLRSEEELLSCIRRETEAGKLPSNVAAGMEELYQ		
Q9FEQ0	N.....HLPHSRAFLDVRSEQELLSYIRREAEAGKLPSNVAAGMEELYQ		
Q9M4V1	SDTGAAEVGHRSRSLRARSEEELLSYIRKEVETGRLSSDIANGLEELYY		
SEQ ID NO: 23	TIEDRAIIDGHSHSFEGIQSEEELMQVIEKEVESGRPKRAGAGMELYR		
	151		200
P10349	NYRNAVIESGNPKADEIVLSNMTVALDRILLVEDPFFVFSHHKAIREPF		
Q9FEP9	NYRNAVIESGNPKADEIVLSNMTVALDRILLVEDPFFVFSHHKAIREPF		
Q39639	NYKNAVFESENPKADEIVLSNMTVALDRILLVEDPFFMFSPHHKAIREFP		
Q9FEQ0	NYKNAVILSGDPRANKIILSNMMAFDRILLVEDPFTFSPHHQAIREFP		
Q9M4V1	NYRNAVILQSGDPRANKIILSNMMAFDRILLVEDPFTFSPHHQAIREFP		
SEQ ID NO: 23	NYRDAVVSSGIVENAMDIVVKVMSTVLDRIILQFEEPFITFGSHHKRMVEPY		
	201		250
P10349	DYYIFGQNYIRPLIDFGNSFVGNLSLFKDIEEKLQQGHNVVLISNHQTEA		
Q9FEP9	DYYIFGQNYIRPLIDFGNSFVGNLSLFKDIEEKLQQGHNVVLISNHQTEA		
Q39639	DYYTFGQNYVRPLIDFENSFVGNLSLFKDIEEKLQQGHNVVLISNHQTEA		
Q9FEQ0	DYYTFGQNYVRPLIDFGNSFVGNPFLFKDIEEKLQQGHNVVLISNHQTEA		
Q9M4V1	DYYMFGQNYIRPLIDFRRSYIGNISIFSDMEEKLQQGHNIVLMSNHQTEA		
SEQ ID NO: 23	DYYTFGQNYVRPLLDFRNSYLGNLKIFDQIEKNLKEGHNVIFLSNHQTEA		

	251	300
P10349	DPAIIISLLLEKTNPYIAENTIFVAGDRVLA DPLCKPFSIGRNLLICVYSKK	
Q9FEP9	DPAIIISLLLEKTNPYIAENTIFVAGDRVLA DPLCKPFSIGRNLLICVYSKK	
Q39639	DPAIIISLLLEKTNPYIAENMIYVAGDRVIA DPLCKPFSIGRNLLICVYSKK	
Q9FEQ0	DPAIIISLLLEKTPYIAENMIYVAGDRVIVD PLCKPFSIGRNLLICVYSKK	
Q9M4V1	DPAIIALLLERTNSHIAETMVFVAGDRVLT DPLCKPFSMGRNLLCVYSKK	
SEQ ID NO: 23	DPAVMALLLEHSHPYLAENLTYVAGDRVVL DPFCKPFSMGRNLLCVYSKK	
	301	350
P10349	HMFDIPELTETKRNTRSLKEMALLLRGGSQLI WIAPSGGRDRPDPSTG	
Q9FEP9	HMFDIPELTETKRNTRSLKEMALLLRGGSQLI WIAPSGGRDRPDPSTG	
Q39639	HMLDIPELAETKRNTRSLKEMALLLRGGSQLI WIAPSGGRDRPDPSTG	
Q9FEQ0	HMFDIPELAETKRNTRSLKEMALLLRGGSQLI WIAPSGGRDRLDPSSG	
Q9M4V1	HMDDVPELIEMKRRANTRSLKEMALLLRGGSQLI WIAPSGGRDRPDPSTG	
SEQ ID NO: 23	HIHDVPDIAEMKIKANAKTLRQMTILLRQGGQYYG.....	
	351	400
P10349	EWYPAPFDASSVDNMRRLIQHSDVPGHLFPL ALLCHDIMPPPSQVEIEIG	
Q9FEP9	EWYPAPFDASSVDNMRRLIQHSDVPGHLFPL ALLCHDIMPPPSQVEIEIG	
Q39639	EWYPAPFDASSVDNMRRLLQHSGAPGHLYPL ALLCYDIMPPPSQVEIEIG	
Q9FEQ0	EWLPAPFDASSMDNMRRLIQHSGVPGHLCPL ALLCYDIMPPPSKVEIEIG	
Q9M4V1	EWHPAPFDVSSVDNMRRLVEHSSVPGHIYPL LLCYEVMPQQVEKQIG	
SEQ ID NO: 23	
	401	450
P10349	EKRVIAFNGAGLSVAPEISFEEIAATHKN PEEVREAYSKALFDVAMQYN	
Q9FEP9	EKRVIAFNGAGLSVAPEISFEEIAATHKN PEEVREAYSKALFDVAMQYN	
Q39639	EKRVISFNGTGLSVGPEISFDEIAASRD NPDEVREAYSKALYDSVAKQYN	
Q9FEQ0	EKRVISFNGVGLSLAPAISFEIAATHRN PDEVREAYSKALFDVSMQYN	
Q9M4V1	ERRTISFHGVGLSVAPELN FNELTAGCETPEEAKEAFSQALYN SVGEQYN	
SEQ ID NO: 23	
	451	476
P10349	VLKTAISGKQGLGASTADVSLSQPW.	
Q9FEP9	VLKTAISGKQGLGASTADVSLSQPW.	
Q39639	VLKAAIDGKQELEASVADVSLSQPWI	
Q9FEQ0	VLKAAIYGRQALRASTADVSLSQPWI	
Q9M4V1	VLKSAIHEHRGLNASNSIISLSQPWQ	
SEQ ID NO: 23	

Figur 17: Vergleich von SEQ ID NO: 27 mit Swiss-Prot Datenbank

SEQ ID NO: 27	1	50
Q9XFW4	MEGGGSIIALPLGLMFLFSGFFINILQLLSVLFILPFSRRAYRVVNIMM	
Q40119	.MAMAAAIVPLGILFFISGLVVNLQAVCYVLVRPMISKNTYRKINRVVA	
Q9SDN3	MAIPAAAFIVPISLLFFMSGLVVNFIQAVFYVLVRPISKDTYRRINTLVA	
Q41745	
Q9SYC8	MAIPLVLVVLPLGLLFLSGLIVNAIQAVLFVTIRPFSKSFYRRINRFLA	
	MKIPAALVFIPVGVLFLISGLIVNIIQLVFFIIVRPFSSRLYRRINKVA	
SEQ ID NO: 27	51	100
Q9XFW4	EVLWSELIWLLDWWANVKVKVYTPKESWEHLGKEHALLICNHRSDIDWLV	
Q40119	ETLWLELVWIVDWWAGVKVQIYFADDETFRNRMGKEHALVVCNHRSDIDWLV	
Q9SDN3	ELLWLELVWVIDWWAGVKVQLYTDTESFRLMGKEHALLICNHRSDIDWLI	
Q41745MGKEHALVISNHRSDIDWLV	
Q9SYC8	ELLWLQLVWVVDWWAGVKVQLHADEETYRSMGKEHALIISNHRSDIDWLI	
	ELLWLQLIWLFDWWACIKINLYVDAETLELIGKEHALVLSNHRSDIDWLI	
SEQ ID NO: 27	101	150
Q9XFW4	GWIIAQRLGCLGGTRAVMKKSTKFLPVIGWSMWFSEYVFLSRDWAKDEKV	
Q40119	GWILAQRSGCLGSALAVMKSSKFLPVIGWSMWFSEYLFLERNWAKDEST	
Q9SDN3	GWVLAQRCGCLSSSIAMMKSSKFLPVIGWSMWFSEYLFLERNWAKDENT	
Q41745	GWVLAQRSGCLGSSLAVMKSSKFLPVIGWSMWFSEYLFLERSWAKDEGT	
Q9SYC8	GWILAQRSGCLGSTLAVMKSSKFLPVIGWSMWFAEYLFLERSWAKDEKT	
	GWVMAQRVGCLGSSLAIMKEAKYLPPIIGWSMWFSDYIFLERSWAKDENT	
SEQ ID NO: 27	151	200
Q9XFW4	LKNGYSSLKGFPRTLWVALFVEGTRFTKAKLEAAQKFAADTGLRVPRHVL	
Q40119	LQSGLQRLNDFFPRPFWLALFVEGTRFTEAKLAAQEYAASELPVPRNV	
Q9SDN3	LKSGLQRLNDFFPKPFWLALFVEGTRFTKAKLLAAQEYAAASAGLPVPRNV	
Q41745	LKSGVQRLKDFPQPFWLALFVEGTRFTQAKLLAAQEYAAATGLPVPRNV	
Q9SYC8	LKWGLQRLKDFPQPFWLALFVEGTRFTPAKLLAAQEYAAASQGLPAPRN	
	VNL	
SEQ ID NO: 27	201	250
Q9XFW4	IPRTKGFSAVENLREFPVVYDMTVAISKELPNPTMIRIFRGQPSVVHV	
Q40119	IPRTKGFSAVSNMRSFVPAIYDMTVAIPKTSPPPTMLRLFKGQPSVVHV	
Q9SDN3	IPRTKGFSAVSNMRSFVPAIYDLTVAIPTITEQPTMLRLFRGKSSVVHV	
Q41745	IPRTKGFSVTAQSQMRSFAPAIYDVTVAIPKSSPAPTMLRLFEGRPSVVHV	
Q9SYC8	IPRTKGFSAVSIMRDFVPAIYDTTVIVPKDSPQPTMLRILKGQSSVIHV	
	IPRTKGFSAVSEIRSFVPAIYDCTLTVHNQPTPTLLRMFSGQSSEINL	

	251		300
SEQ ID NO: 27	HVRVPMSDLPEGANAIKWCHDAFHIKDDRLEQHEKENTFGEDLYIPIE		
Q9XFW4	HIKCHSMKDLPEPEDEIAQWCRDQFVAKDALLDKHTAADTFFPGQKEQNIG		
Q40119	HLKRHLMKDLPKTDDGVAQWCKDQFISKDALLDKHTVAEDTFSGLEVQDIG		
Q9SDN3	HIKRHVMRDLPETDEAVAQWCKDIFVAKDALLDKHTVEQTFGDQQLKVTG		
Q41745	RMKRHAMSEMPKSDEDVSKWCKDIFVAKDALLDKHLATGTFD. EIRPIG		
Q9SYC8	QMRRHKMSELPETDGGIAQWCQDLFITKDAQLEKYFTKDVFSLEVHQIN		
	301		350
SEQ ID NO: 27	RPLKPLIIVVISWAITLLAAWWFLRR..VLSTWKGIAWVAGVLVVVMLCV		
Q9XFW4	RPIKSLAVVVSWAACLLTLGAMKFLHWSNLFSSWKGIALSAFGLGIITLCM		
Q40119	RPMKSLVVVVSWMCLLCLGLVFKFLQWSALLSSWKGMITTFVLGIVTVLM		
Q9SDN3	RPLKSILLVVTAWACLLLILGALKFLYWSLLSSWKGIAFSALGLGVVTVLM		
Q41745	RPFVKSLLVTLFWSCLLLFGAIEFFKWTQLLSTWRGVAFTAAGMALVTGVM		
Q9SYC8	RPIKPLIIVVIIWLGFLVFGFKLLQWLSIVASWKIILLFVFFLVIATITM		
	351		391
SEQ ID NO: 27	QILVMSSQSERSSDPAAKKANQKQAASVAHLGKTD.....		
Q9XFW4	QILIRSSQSERSTPAKVAPAKPKDNHQSGPSSQTEVEEKQK		
Q40119	HILIRSSQSEHSTPAKTRARQTAENPK.....		
Q9SDN3	QILIRFSQSERSTPAPVAPTNNKNKGESSGKPEKQQ.....		
Q41745	HVFIMPSQAERSSSARAARNRVKKE.....		
Q9SYC8	QILIQSSESQRSTPAKRPLQEQLISA.....		

Figur 18: Vergleich von SEQ ID NO: 8 mit Swiss-Prot Datenbank

SEQ ID NO: 8	1	50
P42322	MESTADVGMSDDDPILLNGLETPLLAEPPLGERPTIGPEAPVNPFHEPDG
Q9NWK7
Q9XFJ4MGQREDIRTLSNEYEVTDIPRRGGLSVVRRGTRRRTLHSGQHHE
O35259
Q9FF57
SEQ ID NO: 8	51	100
P42322	GWKTNNEWNYFQMMKSILLIPLLVLVSMITIVAFGYVWIRICLIGVTD
Q9NWK7
Q9XFJ4	VVAIKTLR.RFGPPPAPEKKSLNKSRVPAALISETLLTNELLVMIKIVE
O35259METIMDEVTKRTSAEELESWNLLSRTNYN.
Q9FF57MIEQLGLIIIMGLIHYQSERVKPREWLKLSSSENSR
SEQ ID NO: 8	101	150
P42322	PLFKPFNPFRRMLWGIRLVARAVMFTMGYYYIPIKGKPAHRSEAPIIVS
Q9NWK7
Q9XFJ4	DVSPHPNVIHLYDVCEDPSGVHLILELCGGELFDRIAGQARYNEEGAAA
O35259	...FQYISLRLTILWGLGVLIRYCFLLPLRIALAFTGIGLLVVGTTMVGY
Q9FF57	LG.NTKTNHRRSETGDVSYEQRDLLDISPTLTEAAGAIVDFHCFKTCRCF
SEQ ID NO: 8	151	200
P42322	NHIGFLDPIFVFYRHLPAIVSAKENVEMPIIGLFLQALQIIPVDRDAQS
Q9NWK7
Q9XFJ4	VVRQIAKGLEALHGASIVHRDLKPENCLFLNKDENSPLKIMDFGLSSIED
O35259	LPNGRFKEFLSKHVHLMCYR.
Q9FF57	TLAFGWIIFLSLFIGPVNALLK.
SEQ ID NO: 8	201	250
P42322	RHHAAGNVRRRAVDNMWSHVMLFPQGTTTNGRAIIIAFKTGAFSPGLPVQP
Q9NWK7
Q9XFJ4	FANPVVGLFGSIDYVSPEALSREKITTSDIWSLGVILYILLSGYPPFIA
O35259
Q9FF57GQDRLRKKIER

	251	
SEQ ID NO: 8	MVIRYPHKYVNPSWCDQGGPLVVVLQLMTQFINHMEVEYLPVMKPTVREM	300
P42322	
Q9NWK7	
Q9XFJ4	PSNRQKQQMILNGQFSFDEKTWKNISSLKVDPNMRPTAQEI	
O35259	ICVR.ALTAIITYHN.....	
Q9FF57	VLVEMICSSFFVASWTG.....	
	301	
SEQ ID NO: 8	KYPHEFASRVRSEMAKALGIVCTEHSFLD...IKLALAAEKLKOPSGRSL	350
P42322	MGTNTSSLRP
Q9NWK7	MGN
Q9XFJ4	LEHPWVTGDLAKQEQMADAIVSRLQSFNARRKFRAAAMASILSSFSLRT	
O35259	RKNRPRN.....GG
Q9FF57	VVKYHGPRPSIRP...KQ
	351	
SEQ ID NO: 8	VEFARMEKLFRLLDFPTAKEYLEKFSAMDRTHSGF..VTFEELCTALDLP.	400
P42322	EEVEEMQKGTNFTQKEIKKLYKRFKKLDKGNGT..ISKDEFMLIPELA.	
Q9NWK7	ENSLPMELCSNFDPDEIKRLGKFRKLDLDNSGS..LSVDEFMTLPELQ.	
Q9XFJ4	KKLKKLVGSYDLKPEELENLSHNFKKICKNGENSTLLEFEEVLKAMEMSS	
O35259	ICVANHTSRIDVIIFASDGYYAMVGQVHGLMGVIQRAMVKACPHWFE.	
Q9FF57	VYVANHTSMIDFIVLEQMTAFAVIMQKHPGWVGLLQSTILEVGCIWFN.	
	401	
SEQ ID NO: 8	RSPITKQVFNLFDKDGHGSINFREFLAGLAFVSSHTSFSSSTMEEAFKACD	450
P42322	VNPLVKRVISIFDENGDSVNFKEFIAALSVFNAQGDQRKLEFAFKVYD	
Q9NWK7	QNPLVQRVIDIFDTDGNGEVDFKEFIEGVSQFSVKGDKLSKLRFAFKIYD	
Q9XFJ4	LVPLAPRIFDLFDNNNRDGTVDMREIIGGFSSLKYSQGD.DALRLCFQVYD	
O35259	RSEVKDRHLVAKRLTEHVQDKSKLPILIFPEGTCINNT.SVMMFKGSFE	
Q9FF57	RSEAKDREIVAKKLRDHVQGADSNPLLIFPEGTCVNNN.YTVMFKKGAFE	
	451	
SEQ ID NO: 8	VNGDGTLISRDEVERSLLDIFPELPPI.....TVFKLFDTLDINHDEKIS	500
P42322	IDGDGYISNGELFTVLKMMVGNNLSD.VQLQQIVDKTILEADEDGDGKIS	
Q9NWK7	MDKDGYSNGELFQVLKMMVGNNLKD.TQLQQIVDKTIIHADADGDGKIS	
Q9XFJ4	TDRSGCISKEEVESMLRALPEDCLPINITEPGKLDEIFDLMANDSGKVT	
O35259	IGATVYPVAIKYDPQFGDAFWNSSKYG.....MVTYLLRMMTSWAIIVCSV	
Q9FF57	LDCTVCPIAIKYNKIFVDAFWNSRKQS.....FTMHLLQLMTSWAVVCEV	

	501	550
SEQ ID NO: 8	WEEFSSFLQRNPENYLAIIIYAHPTLLKPPSTS.....	
P42322	FEEFAKTLSHQDLENKMTIRL.....	
Q9NWK7	FEEFCAVVGNMDVHKKMVVDV.....	
Q9XFJ4	FDEFKAAMQRDSSLQDVVLSSLRPN.....	
O35259	WYLPPMTREKDEDAVQFANRVKSAIARQEDW.....	
Q9FF57	WYLEPQTIRPGETGIEFAERVDMISLRAGLKKVPWDGYLKYSRPSPKHS	
	551	568
SEQ ID NO: 8	
P42322	
Q9NWK7	
Q9XFJ4	
O35259	
Q9FF57	ERKQQSFAESTILARLEEK	

Figur 19: Vergleich von SEQ ID NO: 10 mit Swiss-Prot Datenbank

Q24214	1	50
P28470
SEQ ID NO: 10	MTSTENTAMFTEDTSTLNGSTEANHAEFPLGERPTIGPEPPVNPFHESS	
O35259	METIMDDEVTKRTSAEEL
Q9XFJ4	MGQREDIRTLSNEYEVTDIPRRGGLSVVRRGTRRRTLHSGQHHEVVAIKT	
Q24214	51	100
P28470
SEQ ID NO: 10	WSIPQVIKTILLVPLLVIRLLSMFALMMLGYICVKVAMIGCKDPLFKPFN	
O35259	ESWNLLSRTNYNFQYISLRLTILWGLGVILRYCFLP
Q9XFJ4	LRRFGPPPAPEKKSLNKSRVQPQAALISETLLTNELLVMIKIVEDVSPHPN	
Q24214	101	150
P28470
SEQ ID NO: 10	PLRRLLLVSVRLIARGVMVAMGYYYILVKGKPAHRSVAPIIVSNHIGFVD	
O35259LRIALAFTGIGLLVVGTTMVG...
Q9XFJ4	VIHLYDVCEDPSGVHLILELCSGGELFDRIAGQARYNEEGAAAVVRQIAK	
Q24214	151	200
P28470
SEQ ID NO: 10	PIFVFYRHLPVIVSAKEIVEMPIIGMFLQALQIIPVDRINPASRHHAGN	
O35259YLPNGRFKEFLSKH	...
Q9XFJ4	GLEALHGASIVHRDLKPENCLFLNKDENSPLKIMDFGLSSIEDFANPVVG	
Q24214	201	250
P28470
SEQ ID NO: 10	IRRRAAMDNEWPHVMLFPEGTTTNGKALISFKTGAFSPGLPVQPMVIKYPH	
O35259VHLMCYR
Q9XFJ4	LFGSIDYVSPEALSREKITTAKSDIWSLGVILYILLSGYPPFIAPSNRQKQ	
Q24214	251	300
P28470
SEQ ID NO: 10	KYVNPWCNCQGGPLVILFQLMTQFVNMEVEYLPVMTPNVHEIKNPHEFA	
O35259ICVRALTAAITYHNRK
Q9XFJ4	QMILNGQFSFDEKTWKNISSAKQLISSLLKVDPNMRPTAQEILEHPWVT	

	301		350
Q24214	MGNETSLPME
P28470	GNEASYHSE
SEQ ID NO: 10	NRVRTEMAKALGVVCTEHNF..LDIKLKMAAEKLKOPSGRSILVEFARME		
O35259	NRPR.....N.....	GGICVANHT
Q9XFJ4	GDLAKQEQMADAIVSRLQSFNARRKFRAAAMASILSSFSLRTKKLKKLV		
	351		400
Q24214	MCSNFDADAEIRRLGKRFRKLDLD..NSGALSVDLFMSLPELQ.QNPLVQR		
P28470	MGTHFDHDEIKRLGRSFKKMDLD..KSGSLSVDEFMSLPELQ.QNPLVGR		
SEQ ID NO: 10	KLFRLDYSSKAQEYLEKFSAMDPS..HSGYVTVYDEFILKALHLP.PTQITEQ		
O35259	SRIDVIIIFASDGYYAMVGQVHGG..LMGVVIQRAMVKACPHVW.FERSEVK		
Q9XFJ4	GSYDLKPEELENLSHNFKKICKNGENSTILLEFEEVLKAMEMSSLVPLAPR		
	401		450
Q24214	VIDIFDADGNGEVDFKEFIQGVSQFS.VKGDKLSKLRFAFRIYDMDNDGY		
P28470	VIDIFDTDGNGEVDFREFIVGTSQFS.VKGDEEQKLRFAFRIYDMDNDGF		
SEQ ID NO: 10	VFNLFDKNGHGSINFREFVAGLAFLS.THTSFQTTMKAASFKACDVGDGT		
O35259	DRHLVAKRLTEHVQDKSKLPILIFPEGTCINNTSVMFKKGSFEIGATVY		
Q9XFJ4	IFDLFDNNRDGTVDMREIIGGFSSLK..YSQGDDALRLCFQVYDTDRSGC		
	451		500
Q24214	ISNGELFQVLKMMVGNNLKD.TQLQQIVDKTIGFADKDEDGKISFDEFCS		
P28470	ISNGELFQVLKMMVGNNLKD.WQLQQLVDKSILVLDKDGDRISFEFRD		
SEQ ID NO: 10	LTRNEVESSLMAVFP.....ELPPATVLKLFDTLDLNRDGSINWEEFSS		
O35259	PVAIKYDPQFGDAFWN.....SSKYGMVTVYLLRMMTSAIVCS		
Q9XFJ4	ISKEEVESMLRALPEDCLPINITEPGKLDEIFDLMANDSGKVTDEFKA		
	501		532
Q24214	VVGNTDIHKKMVVVDV.....		
P28470	VVRTMEIHKKLVVFDHGQED.....		
SEQ ID NO: 10	FLQRNPEYLAIILAAHPTLLQAPKSEESETNI		
O35259	VWYLPPMTREKDEDAVQFANRVKSAIARQEDW		
Q9XFJ4	AMQRDSSLQDVVLSSLRPN.....		

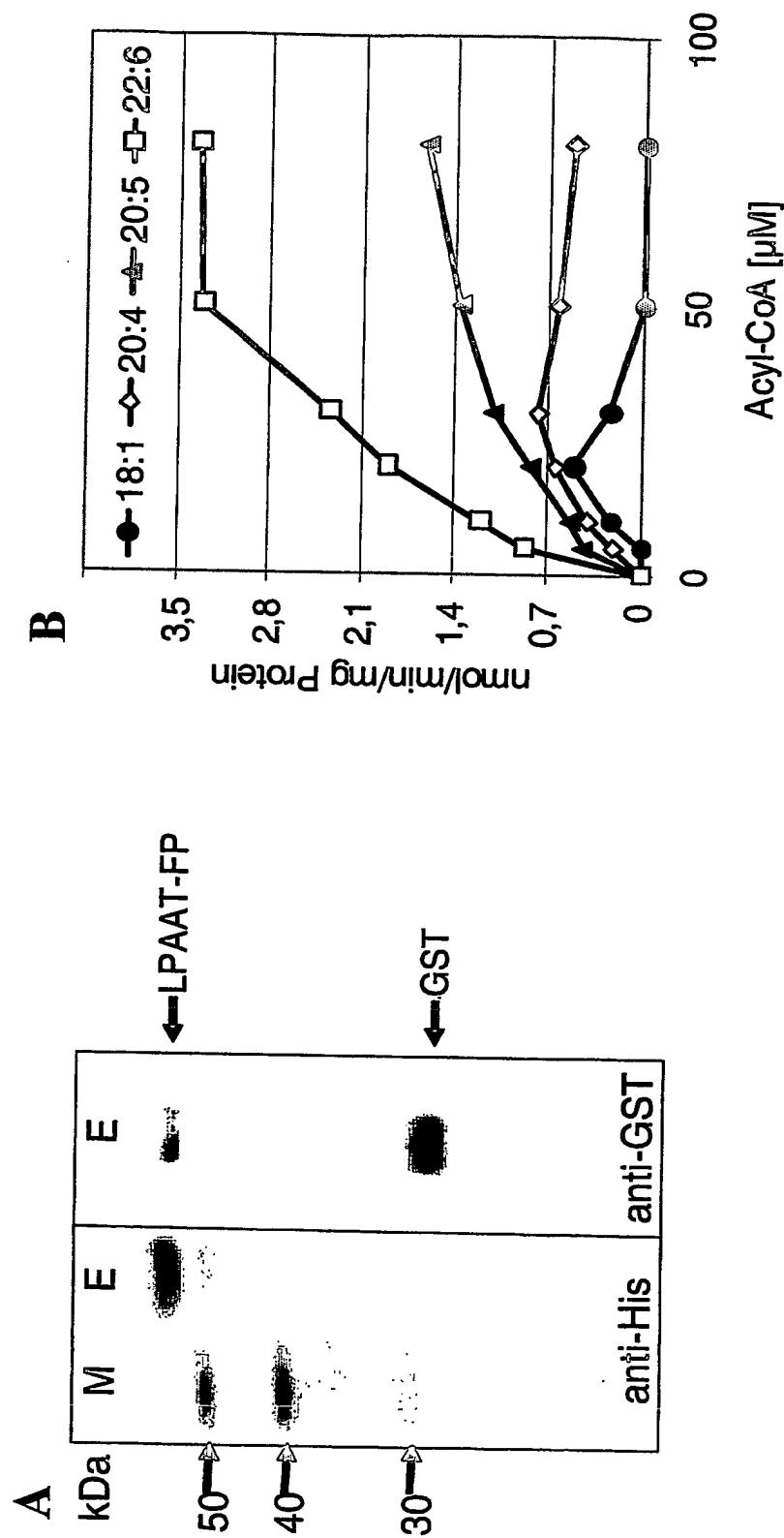
Figur 20: Vergleich von SEQ ID NO: 12 mit Swiss-Prot Datenbank

1	50	
Q9XFW4	.MAMAAAIVPLGILFFISGLVNVNLLQAVCYVLVRPMSKNTYRKINRVVA	
Q9SDN3	
Q40119	MAIPAAAFIVPISLLFFMSGLVNVFIQAVFYVLVRPISKDTYRRINTLVA	
Q41745	MAIPLVVLVVLPLGLLFLLSGLIVNAIQAVLFVTIRPFSKSFYRRINRFLA	
Q9SYC8	MKIPAAALVFIPVGVLFLISGLIVNIIQLVFFIIVRPFSSRLYRRINKVA	
SEQ ID NO: 12MIMM	
51		
Q9XFW4	ETLWLELVWIVDWWAGVKIQVFADDETFRNRMGKEHALVVCNHRSIDDWLV	
Q9SDN3MGKEHALVISNHRSDIDDWLV	
Q40119	ELLWLLELVWVIDWWAGVKVQLYTDTESFRLMGKEHALLICNHRSDIDDWLI	
Q41745	ELLWLQLVWVVDWWAGVKVQLHADEETYRSMGKEHALIISNHRSDIDDWLI	
Q9SYC8	ELLWLQLIWLFDWWACIKINLYVDAETLELIGKEHALVLSNHRSDIDDWLI	
SEQ ID NO: 12	EVLWSELIWLLDWWANVKVKVYTPKESWEHLGKEHALLICNHRSDIDDWLV	
101		
Q9XFW4	GWILAQRSGCLGSALAVMKKSSKFLPVIGWSMWFSEYLFLERNWAKDEST	
Q9SDN3	GWVLAQRSGCLGSSLAVMKKSSKFLPVIGWSMWFSEYLFLERSWAKDEGT	
Q40119	GWVLAQRCGCLSSSIAVMKKSSKFLPVIGWSMWFSEYLFLERNWAKDENT	
Q41745	GWILAQRSGCLGSTLAVMKKSSKFLPVIGWSMWFSEYLFLERSWAKDEKT	
Q9SYC8	GWVMAQRVGCLGSSLAIMKKEAKYLPPIIGWSMWFSDYIFLERSWAKDENT	
SEQ ID NO: 12	GWITAQRLGCLGGTRAVMKKSTKFLPVIGWSMWFSEYVFLSRDWAKDEKV	
151		
Q9XFW4	LQSGLQRLNDFPRPFWLALFVEGTRFTEAKLAAQEYAAASSELPVPRNVL	
Q9SDN3	LKSGVQRLKDFPQPFWLALFVEGTRFTQAKLLAAQEYAAATGLPVPRNVL	
Q40119	LKSGLQRLNDFPKPFWLALFVEGTRFTKAKLLAAQEYAAASAGLPVPRNVL	
Q41745	LKWGLQRLKDFPRPFWLALFVEGTRFTPQKLLAAQEYAAASQGLPAPRNVL	
Q9SYC8	LKAGFKRLEDFFPMTFWLALFVEGTRFTQEKLEAAQEYASIRSLPSPRNVL	
SEQ ID NO: 12	LKNGYSSLKGFPTLWVALFVEGTRFTKAKLEVAQKFAADTGLRVPRYVL	
201		
Q9XFW4	IPRTKGFVSAVSNMRSFVPAIYDMTVAIPKTSPPPTMLRLFKQPSVHV	
Q9SDN3	IPRTKGFVTAVSQMRSFAPAIYDVTVAIPKSSPAPTMLRLFEGRPSVHV	
Q40119	IPRTKGFVSAVSNMRSFVPAIYDLTVAIPKTTQOPTMLRLFRGKSSVHV	
Q41745	IPRTKGFVSAVSIMRDFVPAIYDTTVIVPKDSPQOPTMLRILKGQSSVIHV	
Q9SYC8	IPRTKGFVSAVSEIRSFVPAIYDCTLTIVHNQPTPTLLRMFSGQSSEINL	
SEQ ID NO: 12	VPRTKGFVSAVENLREFVPPVYDMTVAISKELPNPTMIRIFRGQPSVHV	

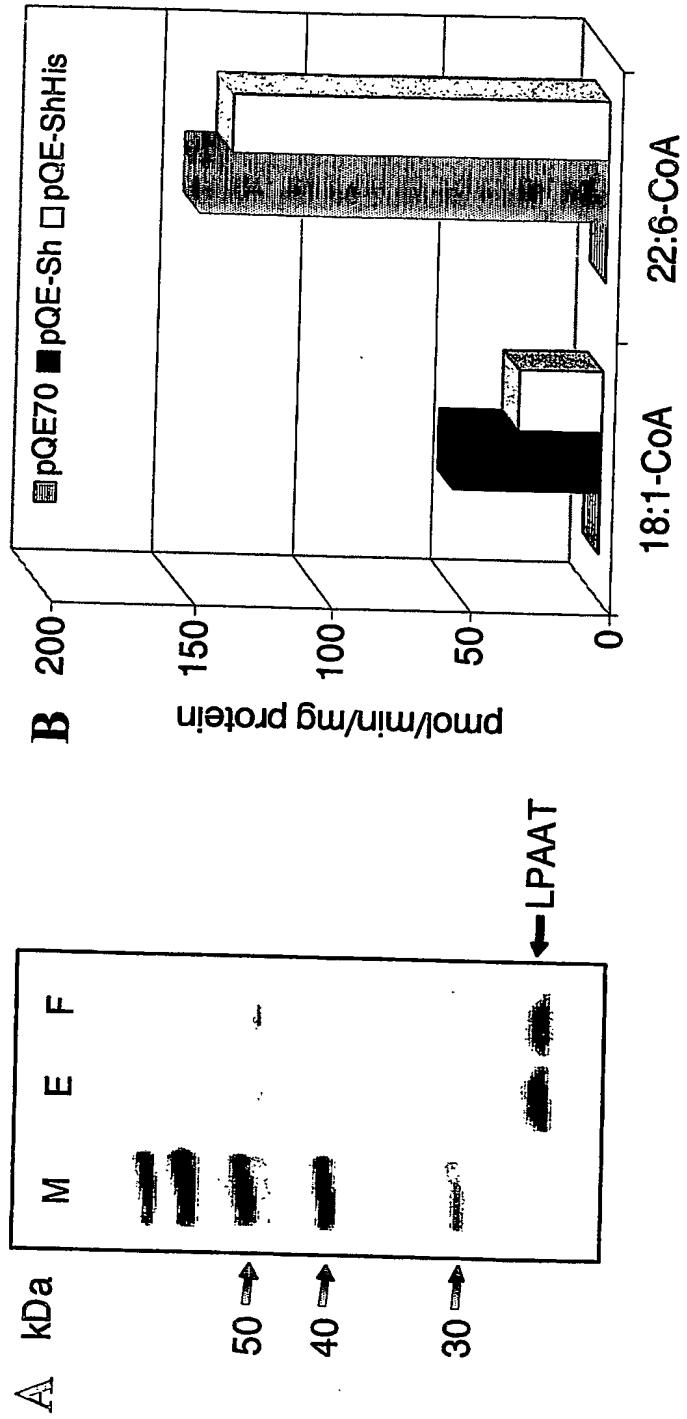
31/37

	251	
Q9XFW4	HIKCHSMKDLPEPEDEIAQWCRDQFVAKDALLDKHTIAADTFPGQKEQNIG	
Q9SDN3	HIKRHVMRDLPETDEAVAQWCKDIFVAKDALLDKHTVEQTFGDQQLKVTG	
Q40119	HLKRHLMKDLPKTDDGVAQWCKDQFISKDALLDKVAEDTFSGLEVQDIG	
Q41745	RMKRHAMSEMPKSDEDVSKWCKDIFVAKDALLDKHLATGTFD.EEIRPIG	
Q9SYC8	QMRRHKMSELPETDDGIAQWCQDLFITKDAQLEKYFTKDVFSDELHQIN	
SEQ ID NO: 12	YVRRVPMSDLPEGANAISWKCHDAFHIKDDRLEQHEKENTFGEDLYIPIE	
	301	350
Q9XFW4	RPIKSLAVVVSWACLLTLGAMKFLHWSNLFSSWKGIALSAFGLGIITLCM	
Q9SDN3	RPLKSLLVVVTAWACLLLILGALKFLYWSLLSSWKGIAFSALGLGVVTVLM	
Q40119	RPMKSLVVVVSWMCLLCLGLVKFLQWSALLSSWKGMITTFLVGLIVTVLM	
Q41745	RPVKSLLVTLFWSCLLFGAIEFFKWTQLLSTWRGVAFTAAGMALVTGVM	
Q9SYC8	RPIKPLIVVIIWLGFVFGGFKLLQWLSTIVASWKIILLFVFFLVIATITM	
SEQ ID NO: 12	RPLKPLIIVVISWAITLLAAWWFLRR..VLSTWKGIAWVAGVLVVVMLCV	
	351	391
Q9XFW4	QILIRSSQSERSTPAKVAPAKPKDNHQSGPSSQTEVEEKQK	
Q9SDN3	QILIRFSQSERSTPAPVAPTNKNKGESSGKPEKQQ.....	
Q40119	HILIRSSQSEHSTPAKTRARQTAENPK.....	
Q41745	HVFIMFSQAERSSSARAARNRVKE.....	
Q9SYC8	QILIQSSESQRSTPAKRPLQEQLISA.....	
SEQ ID NO: 12	QILVMSSQSERSSDPAAKKANQKQAASVAHLGKTD.....	

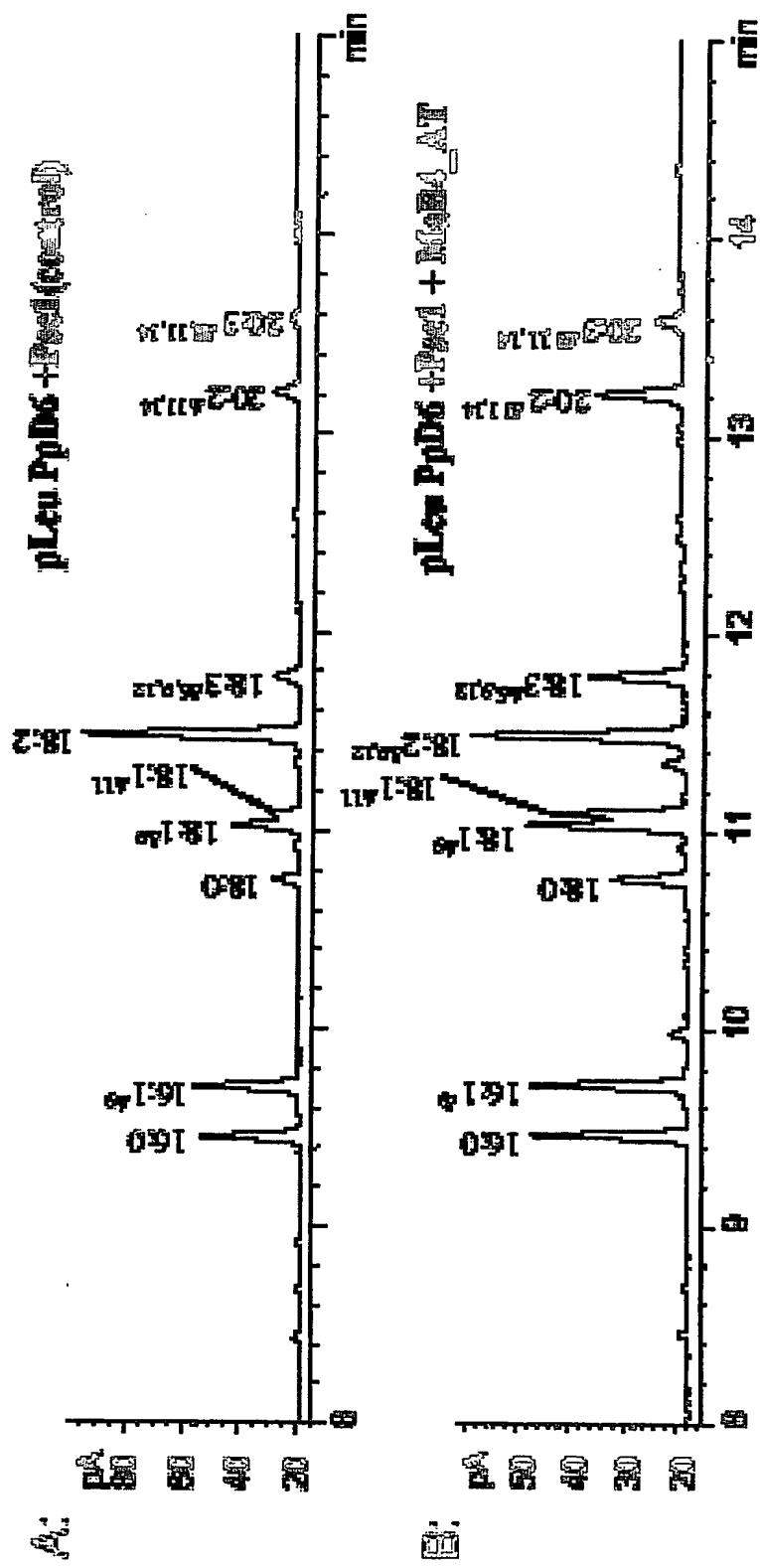
Figure 21: **A.** Western-Blot-Analysen der in *E. coli* als Fusionsproteine (LPAAT-FP) mit N-terminalem GST- und C-terminalem His-tag exprimierten *Thraustochytrium*-LPAAT. **B.** Acyl-CoA-Spezifität der als GST-Fusionsprotein exprimierten *Thraustochytrium*-LPAAT in *E. coli*.



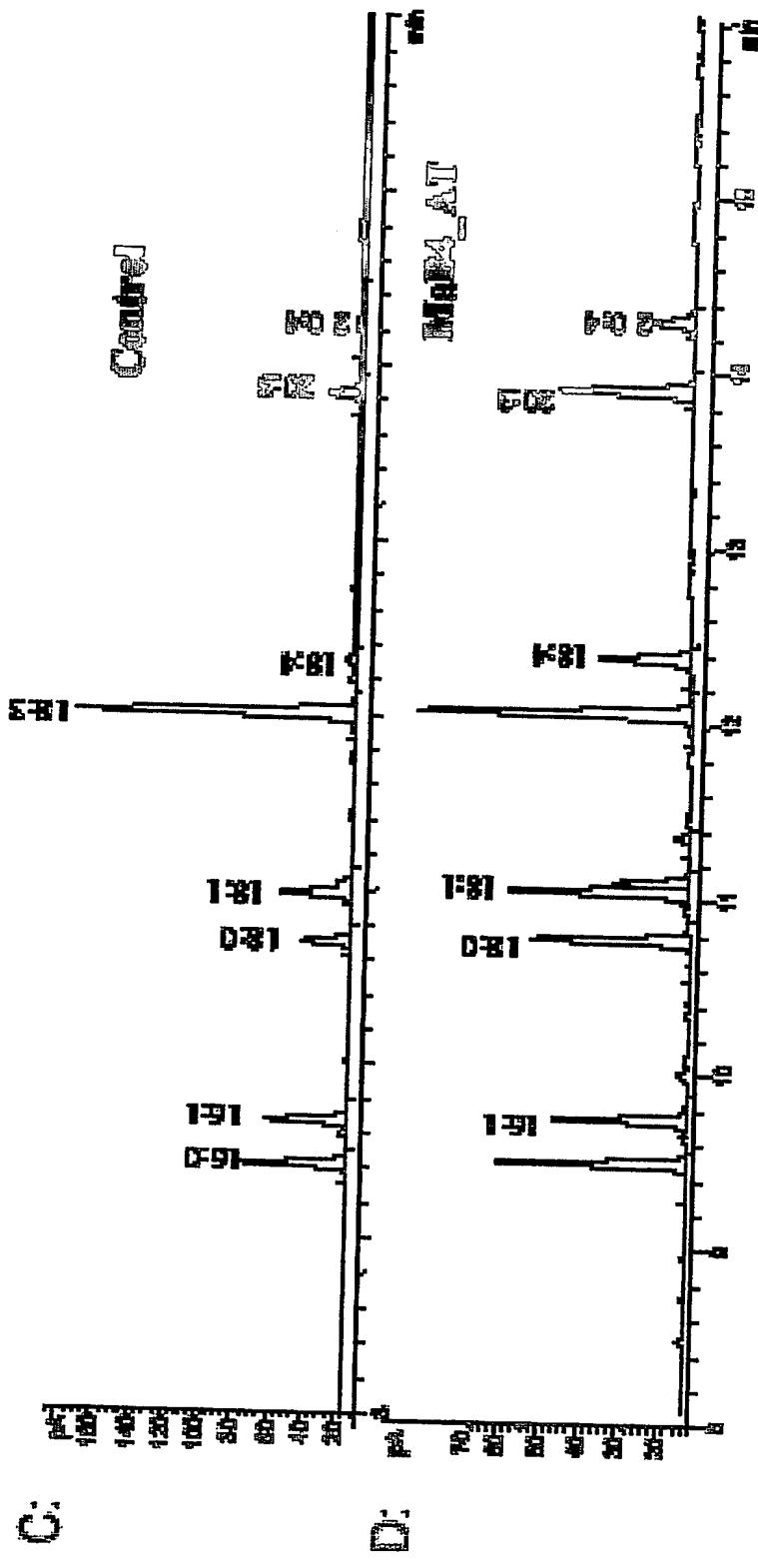
Figur 22:
A: Western-Blot-Analyse der in *E. coli* als Fusionsprotein mit C-terminalen His-tag exprimierten *Shewanella*-LPAAT.
B: Funktionale Expression der *Shewanella*-LPAAT in *E. coli*



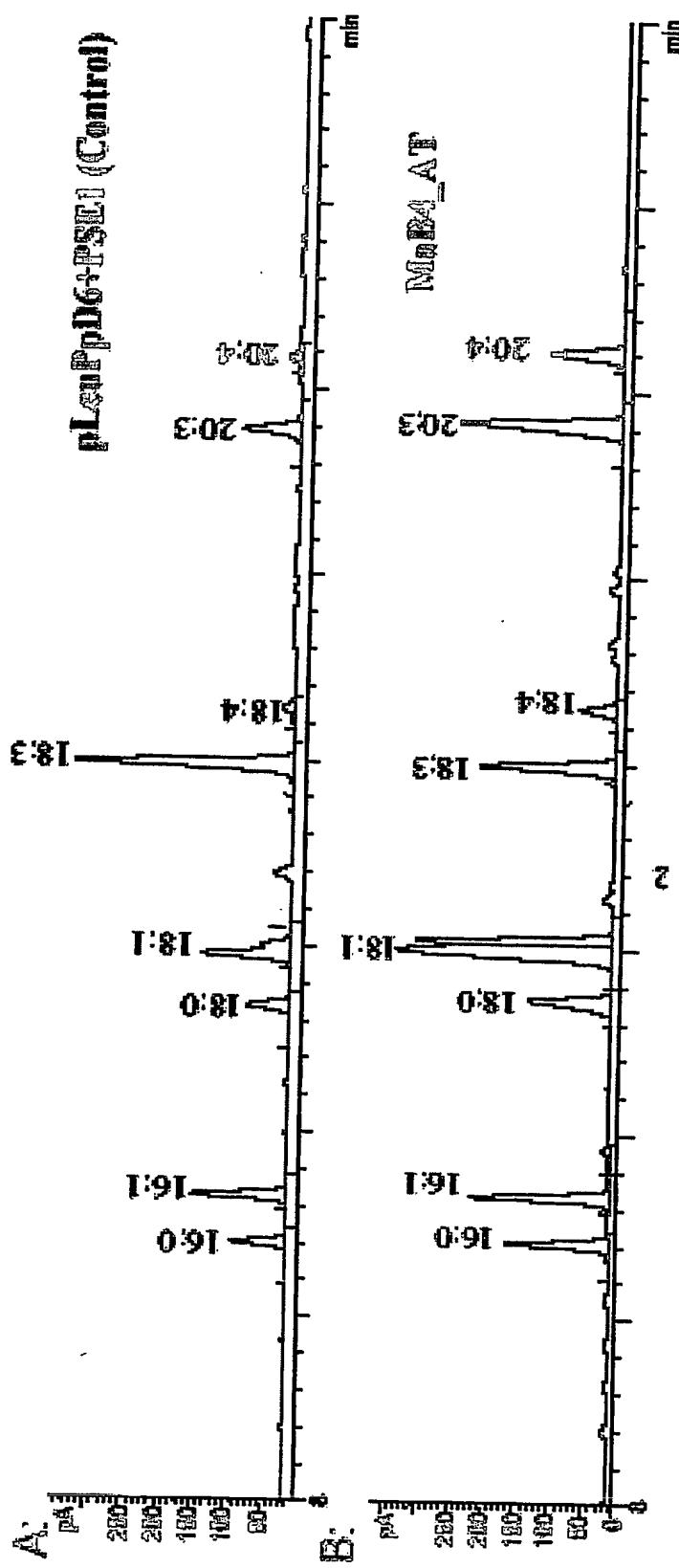
Figur 23: Expression von Mortierella LPAAT (MaB4_AT) in Hefe und Fütterung von 18:2 Δ9,12 Fetsäuren (A + B)



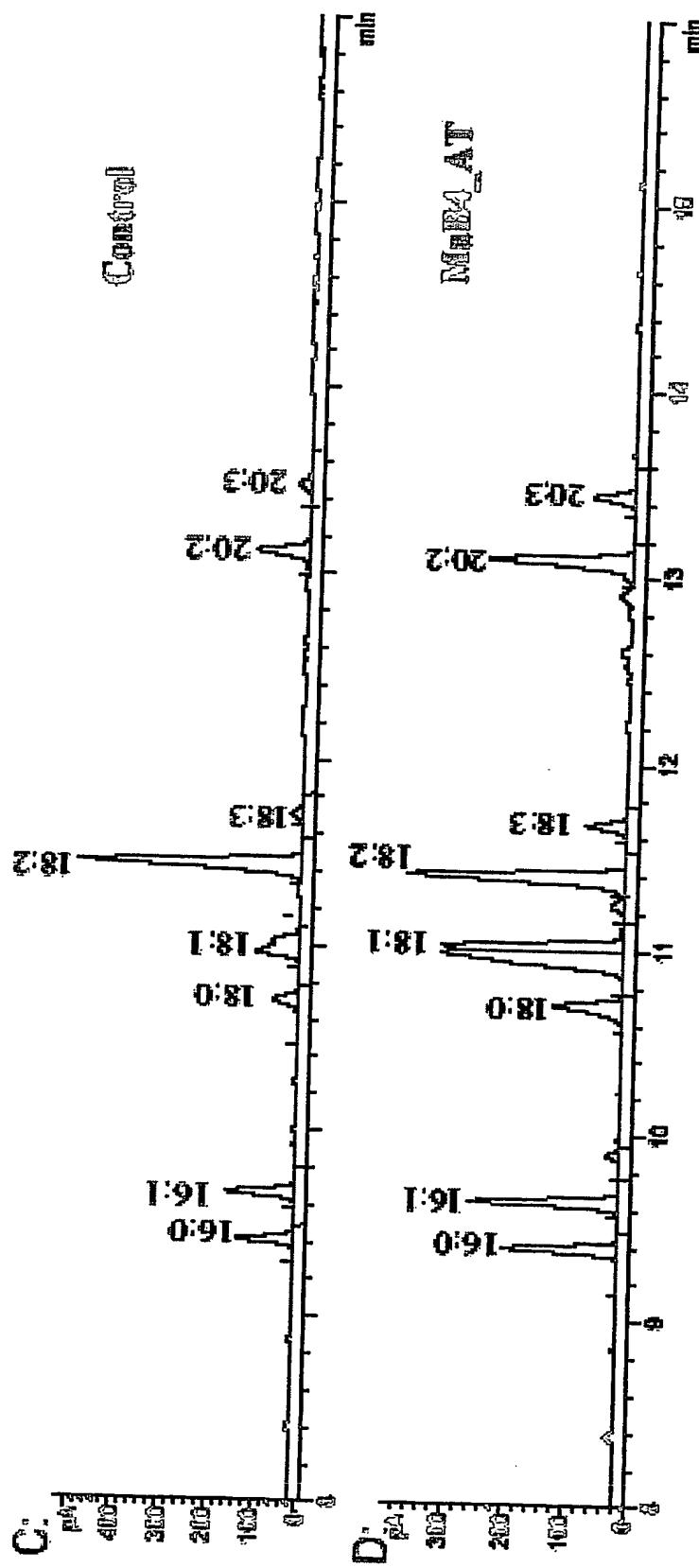
Figur 24: Expression von Mortierella LPAAT (MaB4_AT) in Hefe und Fütterung von 18:3 Δ9,12,15 Fettsäuren (C + D)



Figur 25: Expression von Mortierella LPAAT (MaB4_AT) in Hefe und Fütterung von 18:2 Δ9,12 Fettsäuren (A + B). Analyse der Neutrallipide.



Figur 26: Expression von Mortierella LPAAT (MaB4_AT) in Hefe und Fütterung von 18:3 Δ9,12,15 Fettsäuren (C + D). Analyse der Neutrallipide.



SEQUENCE LISTING

<110> BASF Plant Science GmbH
 <120> Neue pflanzliche Acyltransferasen spezifisch für langkettige
 mehrfach ungesättigte Fettsäuren
 <130> AE20011000
 <140> AE20011000
 <141> 2003-03-31
 <160> 74
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1047
 <212> DNA
 <213> Thraustochytrium
 <220>
 <221> CDS
 <222> (38)...(952)
 <223> LPAAT
 <400> 1

gggcgggtgtc cggccgttcg agcgcgtgga cgccaaac atg agc gcg tgg acg agg	55
Met Ser Ala Trp Thr Arg	
1 5	
gcc aag acc gcc gtg ggc ctc ctg acg ctg gcg cct gcg cgg ata gtg	103
Ala Lys Thr Ala Val Gly Leu Leu Thr Leu Ala Pro Ala Arg Ile Val	
10 15 20	
ttc ctc gtg act gtc ctg ggc acg tac ggg ctc acg gtc gcg gcc tgc	151
Phe Leu Val Thr Val Leu Gly Thr Tyr Gly Leu Thr Val Ala Ala Cys	
25 30 35	
acg cga ctt ggc gtc ccg aaa agc ttc gtg ctg ggc ctg acg cgg tgc	199
Thr Arg Leu Gly Val Pro Lys Ser Phe Val Leu Gly Leu Thr Arg Cys	
40 45 50	
gtc gcg cga ctc acg ctc tgg ggg ctt ggg ttc tac cac att gag gtc	247
Val Ala Arg Leu Thr Leu Trp Gly Leu Gly Phe Tyr His Ile Glu Val	
55 60 65 70	
tct tgc gac gcc caa ggc ctt cgg gag tgg ccg cgc gtg att gtc gcg	295
Ser Cys Asp Ala Gln Gly Leu Arg Glu Trp Pro Arg Val Ile Val Ala	
75 80 85	
aac cac gtc tcg tac ctg gag atc ttg tac ttc atg tcg acc gtg cac	343
Asn His Val Ser Tyr Leu Glu Ile Leu Tyr Phe Met Ser Thr Val His	
90 95 100	
tgc ccg tct ttc gtc atg aag aag acc tgc ctc cga gtc ccg ctt gtc	391
Cys Pro Ser Phe Val Met Lys Lys Thr Cys Leu Arg Val Pro Leu Val	
105 110 115	

ggc tac att gcc atg gag ctg ggc ggt gtg att gtg gac cgc gag ggc	439
Gly Tyr Ile Ala Met Glu Leu Gly Gly Val Ile Val Asp Arg Glu Gly	
120 125 130	
ggc ggt caa agc gca tcg gcg atc att cgc gac cgc gtg cag gag cct	487
Gly Gly Gln Ser Ala Ser Ala Ile Ile Arg Asp Arg Val Gln Glu Pro	
135 140 145 150	
cct cga gat tcg tcg agc gag aag cac cac gcg cag ccg ctt ctt gtg	535
Pro Arg Asp Ser Ser Glu Lys His His Ala Gln Pro Leu Leu Val	
155 160 165	
ttc ccc gag ggg acc acc acc aat gga agc tgc ctg ctc caa ttc aag	583
Phe Pro Glu Gly Thr Thr Asn Gly Ser Cys Leu Leu Gln Phe Lys	
170 175 180	
acg gga gcc ttt cgt cct ggg gct ccg gtg ctt ccg gtc gtg ctt gag	631
Thr Gly Ala Phe Arg Pro Gly Ala Pro Val Leu Pro Val Val Leu Glu	
185 190 195	
ttt ccg att gac aaa gcg cgt ggt gac ttt tcc ccg gcg tac gaa tcg	679
Phe Pro Ile Asp Lys Ala Arg Gly Asp Phe Ser Pro Ala Tyr Glu Ser	
200 205 210	
gtc cac acg cca gct cac ctc ctt cgc atg ctc gca caa tgg agg cac	727
Val His Thr Pro Ala His Leu Leu Arg Met Leu Ala Gln Trp Arg His	
215 220 225 230	
cgg ctt cgg gtg cgc tat ctt cct ctg tat gag ccc tct gcg gct gag	775
Arg Leu Arg Val Arg Tyr Leu Pro Leu Tyr Glu Pro Ser Ala Ala Glu	
235 240 245	
aag gtt gat gca gac ctt tat gcg cgg aac gtg cgc gac gaa atg gcg	823
Lys Val Asp Ala Asp Leu Tyr Ala Arg Asn Val Arg Asp Glu Met Ala	
250 255 260	
cgc gcg ctc aag gta ccc act gtg gag cag tct tac cgc gac aag ctc	871
Arg Ala Leu Lys Val Pro Thr Val Glu Gln Ser Tyr Arg Asp Lys Leu	
265 270 275	
gtc tac cac gcg gat ctc atg ccg cac tac cag aag gcc ggc ccc gga	919
Val Tyr His Ala Asp Leu Met Pro His Tyr Gln Lys Ala Gly Pro Gly	
280 285 290	
gcf ctc tat ctg tac gtc cga cct gac ctc ttg tagcactcat gcgcgccca	972
Ala Leu Tyr Leu Tyr Val Arg Pro Asp Leu Leu	
295 300 305	
agcgggtccag caacgggaga ttaaaaacacg atttcttagc ctacaaaaaa aaaaaaaaaa	1032
aaaaaaaaaaa aaaaa	1047

<210> 2

<211> 305
<212> PRT<213> Thraustochytrium
<400> 2

Met Ser Ala Trp Thr Arg Ala Lys Thr Ala Val Gly Leu Leu Thr Leu	
1 5 10 15	
Ala Pro Ala Arg Ile Val Phe Leu Val Thr Val Leu Gly Thr Tyr Gly	
20 25 30	
Leu Thr Val Ala Ala Cys Thr Arg Leu Gly Val Pro Lys Ser Phe Val	
35 40 45	

Leu Gly Leu Thr Arg Cys Val Ala Arg Leu Thr Leu Trp Gly Leu Gly
 50 55 60
 Phe Tyr His Ile Glu Val Ser Cys Asp Ala Gln Gly Leu Arg Glu Trp
 65 70 75 80
 Pro Arg Val Ile Val Ala Asn His Val Ser Tyr Leu Glu Ile Leu Tyr
 85 90 95
 Phe Met Ser Thr Val His Cys Pro Ser Phe Val Met Lys Lys Thr Cys
 100 105 110
 Leu Arg Val Pro Leu Val Gly Tyr Ile Ala Met Glu Leu Gly Gly Val
 115 120 125
 Ile Val Asp Arg Glu Gly Gly Gln Ser Ala Ser Ala Ile Ile Arg
 130 135 140
 Asp Arg Val Gln Glu Pro Pro Arg Asp Ser Ser Ser Glu Lys His His
 145 150 155 160
 Ala Gln Pro Leu Leu Val Phe Pro Glu Gly Thr Thr Thr Asn Gly Ser
 165 170 175
 Cys Leu Leu Gln Phe Lys Thr Gly Ala Phe Arg Pro Gly Ala Pro Val
 180 185 190
 Leu Pro Val Val Leu Glu Phe Pro Ile Asp Lys Ala Arg Gly Asp Phe
 195 200 205
 Ser Pro Ala Tyr Glu Ser Val His Thr Pro Ala His Leu Leu Arg Met
 210 215 220
 Leu Ala Gln Trp Arg His Arg Leu Arg Val Arg Tyr Leu Pro Leu Tyr
 225 230 235 240
 Glu Pro Ser Ala Ala Glu Lys Val Asp Ala Asp Leu Tyr Ala Arg Asn
 245 250 255
 Val Arg Asp Glu Met Ala Arg Ala Leu Lys Val Pro Thr Val Glu Gln
 260 265 270
 Ser Tyr Arg Asp Lys Leu Val Tyr His Ala Asp Leu Met Pro His Tyr
 275 280 285
 Gln Lys Ala Gly Pro Gly Ala Leu Tyr Leu Tyr Val Arg Pro Asp Leu
 290 295 300
 Leu
 305

<210> 3
 <211> 1701

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*
 <220>

<221> misc_feature
 <223> LPAAT

<400> 3

ggcacgaggg aaattggctt tctatgtggc cgtacttatt cgaggaggc aacgaaacaa 60
 aggtatgtct tattaatgaa aatgtctcca cacatgtatg ttgttttaggt atattctgtc 120
 aactgaaaaac ttgttttaat tttttcttaa attgaaattc tgtgcctgaa agccaaactct 180
 aggtccatca taatgttagca atatgatcag aagcgctcaa atgtgtcgtg aaagtttgct 240
 tttgcaattt tctttgctg ttaacctatt gattatgttg gaaccacaat acagacgctg 300

4

cttcacttca ttcttatggc aatgaatgtc gtgatgattc cggttaattt catcctacag	360
ggatatggat gttgtaaaagg tgattttgc aggtgataaa gtacctaagg agaaccgtgt	420
gatggtcatg tcaaccatc gtaccgaagt ggactggatg tacatttggaa acttagcaat	480
tcggaaaggc aagattgggt actgcaagta tgcggtaag aactcaagtaaaacttacc	540
cttggtttgt tggcattttt acgttttga gtttctgatg ctgcataagaa agtggaaagt	600
ggatgcctcc gtcataaga catacattga cagtttcaa gataaaagag atcctctctg	660
gctagtcgtg ttccctgaag gcacagattt ttcgtaaggc tgaagtaccc atccatggc	720
ttgatgtata tctgcaatct tctctataat ctgcatttat tctcttgtt ttctctagca	780
agtaaatcat acttgcttaa tgtacttagc aatttgcattttgactta ttgtgatgta	840
aatgtgattg actactatga cagtgaagcg aaacgggaca cgggcaatgc aatttggaaaga	900
gagaaaggct atccggagct tgtcaatgtc ctcaacctc gcactcgtgg ctttgtgact	960
tgcctttctc aatcgcgctg ctctttggat gcagtttatg acctcaactat agggtacaag	1020
aaggcgtgtc ccttggatcat caacaatgtc ttccgaaaccg atccatcgga agtgcacatt	1080
cacattcgcc gaataccat ttctgagatt ctcaatcag aagacggtat gacgcagtgg	1140
ctgtatgatc tattttatca aaaggaccag atgttggca gtttttagtaa gacaggctct	1200
ttccctgaca gtggaaattga agagaccctt ttgaacatag tggaaagggtgt ttgcaatgtt	1260
gctctacacg tagtccttag cgggttggta ttctggtgct tggttcattt gggttgggtt	1320
aagctttatg tggcttcgc tagtttgctg ctgcgttta gtacctatttt tgattggaga	1380
cctaaaccgg ttactctag tctacgtact aaaagaaaaa tcgtgtaaaaa taaattcgtt	1440
agttgttaatt ggtttggtaa ttccgattcc aaagctgagt ttaagggtga ggctcccttt	1500
taagctgatt ttgcattttt atggctgct cccttggtttgc tctggcttaa attggcttta	1560
atacgggtgt ctctgtgtca tgaacctcag tgcttcaaga cgtatgtggcc ttttagccctt	1620
ctcccttacc catcttgacc agatgccaaa ctgcataaa agcagatcaa taggtcgtgc	1680
ccccaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa a	1701

<210> 4

<211> 714
<212> DNA

<213> Physcomitrella patens
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(714)
<223> LPAAT

<400> 4

atg gct ttg atg tat atc tgc aat ctt ctc tat aat ctg cat tta ttc	48
Met Ala Leu Met Tyr Ile Cys Asn Leu Leu Tyr Asn Leu His Leu Phe	
1 5 10 15	
tct gtt gtt tct cta gca agt aaa tca tac ttg ctt aat gta ctt agc	96
Ser Val Val Ser Leu Ala Ser Lys Ser Tyr Leu Leu Asn Val Leu Ser	
20 25 30	
aat ttg tca ttt ttg act tat tgt gat gta aat gtg att gac tac tat	144
Asn Leu Ser Phe Leu Thr Tyr Cys Asp Val Asn Val Ile Asp Tyr Tyr	
35 40 45	
gac agt gaa gcg aaa cgg gac acg ggc aat gca att gga aga gag aaa	192
Asp Ser Glu Ala Lys Arg Asp Thr Gly Asn Ala Ile Gly Arg Glu Lys	
50 55 60	
ggc tat ccg gag ctt gtc aat gtg ctt caa cct cgc act cgt ggc ttt	240
Gly Tyr Pro Glu Leu Val Asn Val Leu Gln Pro Arg Thr Arg Gly Phe	

5

65	70	75	80	
gtg act tgc ctt tct caa tcg cgc tgc tct ttg gat gca gtt tat gac				288
Val Thr Cys Leu Ser Gln Ser Arg Cys Ser Leu Asp Ala Val Tyr Asp				
85	90	95		
ctc act ata ggg tac aag aag cgg tgt ccc ttg ttc atc aac aat gta				336
Leu Thr Ile Gly Tyr Lys Lys Arg Cys Pro Leu Phe Ile Asn Asn Val				
100	105	110		
ttc gga acc gat cca tcg gaa gtg cac att cac att cgc cga ata cca				384
Phe Gly Thr Asp Pro Ser Glu Val His Ile His Ile Arg Arg Ile Pro				
115	120	125		
att tct gag att cct caa tca gaa gac ggt atg acg cag tgg ctg tat				432
Ile Ser Glu Ile Pro Gln Ser Glu Asp Gly Met Thr Gln Trp Leu Tyr				
130	135	140		
gat cta ttt tat caa aag gac cag atg ttg gcc agt ttt agt aag aca				480
Asp Leu Phe Tyr Gln Lys Asp Gln Met Leu Ala Ser Phe Ser Lys Thr				
145	150	155	160	
ggc tct ttc cct gac agt gga att gaa gag agc cct ttg aac ata gtg				528
Gly Ser Phe Pro Asp Ser Gly Ile Glu Glu Ser Pro Leu Asn Ile Val				
165	170	175		
gaa ggt gtt tgc aat gtt gct cta cac gta gtc ctt agc ggt tgg gta				576
Glu Gly Val Cys Asn Val Ala Leu His Val Val Leu Ser Gly Trp Val				
180	185	190		
ttc tgg tgc ttg ttt cat tcg gtt tgg ttg aag ctt tat gtg gct ttc				624
Phe Trp Cys Leu Phe His Ser Val Trp Leu Lys Leu Tyr Val Ala Phe				
195	200	205		
gct agt ttg ctg ctc gcg ttt agt acc tat ttt gat tgg aga cct aaa				672
Ala Ser Leu Leu Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Asp Trp Arg Pro Lys				
210	215	220		
ccg gtt tac tct agt cta cgt act aaa aga aaa atc gtg taa				714
Pro Val Tyr Ser Ser Leu Arg Thr Lys Arg Lys Ile Val				
225	230	235		

<210> 5

<211> 237

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 5

Met Ala Leu Met Tyr Ile Cys Asn Leu Leu Tyr Asn Leu His Leu Phe				
1	5	10	15	
Ser Val Val Ser Leu Ala Ser Lys Ser Tyr Leu Leu Asn Val Leu Ser				
20	25	30		
Asn Leu Ser Phe Leu Thr Tyr Cys Asp Val Asn Val Ile Asp Tyr Tyr				
35	40	45		
Asp Ser Glu Ala Lys Arg Asp Thr Gly Asn Ala Ile Gly Arg Glu Lys				
50	55	60		
Gly Tyr Pro Glu Leu Val Asn Val Leu Gln Pro Arg Thr Arg Gly Phe				
65	70	75	80	
Val Thr Cys Leu Ser Gln Ser Arg Cys Ser Leu Asp Ala Val Tyr Asp				
85	90	95		

6

Leu Thr Ile Gly Tyr Lys Lys Arg Cys Pro Leu Phe Ile Asn Asn Val
 100 105 110
 Phe Gly Thr Asp Pro Ser Glu Val His Ile His Ile Arg Arg Ile Pro
 115 120 125
 Ile Ser Glu Ile Pro Gln Ser Glu Asp Gly Met Thr Gln Trp Leu Tyr
 130 135 140
 Asp Leu Phe Tyr Gln Lys Asp Gln Met Leu Ala Ser Phe Ser Lys Thr
 145 150 155 160
 Gly Ser Phe Pro Asp Ser Gly Ile Glu Glu Ser Pro Leu Asn Ile Val
 165 170 175
 Glu Gly Val Cys Asn Val Ala Leu His Val Val Leu Ser Gly Trp Val
 180 185 190
 Phe Trp Cys Leu Phe His Ser Val Trp Leu Lys Leu Tyr Val Ala Phe
 195 200 205
 Ala Ser Leu Leu Leu Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Asp Trp Arg Pro Lys
 210 215 220
 Pro Val Tyr Ser Ser Leu Arg Thr Lys Arg Lys Ile Val
 225 230 235

<210> 6

<211> 507

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> misc_feature

<223> LPAAT

<400> 6

accaggtcga gatgccatt attggactgt tttgcaagc tttcaaata ataccgtgg 60
 accggactga tgctcagtct aggcaccatg cggctggcaa cggtcgccga agggctgtgg 120
 acaatatgtg gtcccacgtc atgttgtcc cggagggcac taccaccaat ggcagagcaa 180
 taatccctt caaaacagga gcatttcgc ctggtctccc tgtcagcca atggttatta 240
 gataccctca caagtatgtc aaccctctt ggtgtgacca aggaggtccg ttggtcgttg 300
 tggcagct gatgactcg ttcataacc acatggaggt tgaatatttgc cccgtcatga 360
 agccaaactgt gagagagatg aaataccctc atgaattcgc aagtagagtt cgcagcgaga 420
 tggctaaagc gttaggcatc gtgtgcacag aacacagctt tctggatatt aagctagcgc 480
 tggctgcaga aaagctaaa cagcatt 507

<210> 7

<211> 1566

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1566)
 <223> LPAAT

<400> 7

atg gag agc aca gca gat gtc gga atg tcc gac gac gat cct atc ctt	48
Met Glu Ser Thr Ala Asp Val Gly Met Ser Asp Asp Asp Pro Ile Leu	
1 5 10 15	
ctc aac ggg ctc gaa acg cca cta ctg gct gaa ttt cct ctt ggc gaa	96
Leu Asn Gly Leu Glu Thr Pro Leu Leu Ala Glu Phe Pro Leu Gly Glu	
20 25 30	
cgg cct aca ata ggg ccg gag gca cca gta aat ccc ttc cat gaa ccc	144
Arg Pro Thr Ile Gly Pro Glu Ala Pro Val Asn Pro Phe His Glu Pro	
35 40 45	
gat ggt ggt tgg aag acc aac gag tgg aat tac ttt caa atg atg	192
Asp Gly Gly Trp Lys Thr Asn Asn Glu Trp Asn Tyr Phe Gln Met Met	
50 55 60	
aaa tcc att ttg ctg att cca ctt ctt ctc gtt cgt cta gtg agc atg	240
Lys Ser Ile Leu Leu Ile Pro Leu Leu Val Arg Leu Val Ser Met	
65 70 75 80	
ata aca atc gta gca ttt gga tat gtg tgg atc agg att tgt ctg atc	288
Ile Thr Ile Val Ala Phe Gly Tyr Val Trp Ile Arg Ile Cys Leu Ile	
85 90 95	
ggc gtc aca gat ccc ttg ttt aag cct ttc aat ccg tgt cga cgg ttc	336
Gly Val Thr Asp Pro Leu Phe Lys Pro Phe Asn Pro Cys Arg Arg Phe	
100 105 110	
atg ctg tgg ggc ata cgg tta gta gca aga gca gtg atg ttt acc atg	384
Met Leu Trp Gly Ile Arg Leu Val Ala Arg Ala Val Met Phe Thr Met	
115 120 125	
ggt tat tac tac att ccc atc aag gga aaa ccg gct cac cga tca gag	432
Gly Tyr Tyr Ile Pro Ile Lys Gly Lys Pro Ala His Arg Ser Glu	
130 135 140	
gcg ccc att att gtg tcc aat cac att gga ttt ctg gat ccc atc ttt	480
Ala Pro Ile Ile Val Ser Asn His Ile Gly Phe Leu Asp Pro Ile Phe	
145 150 155 160	
gtg ttc tat cgg cac ttg ccg gcc atc gtc tca gcc aag gag aac gtc	528
Val Phe Tyr Arg His Leu Pro Ala Ile Val Ser Ala Lys Glu Asn Val	
165 170 175	
gag atg ccc att att gga ctg ttt ttg caa gct ttg caa ata ata ccc	576
Glu Met Pro Ile Ile Gly Leu Phe Leu Gln Ala Leu Gln Ile Ile Pro	
180 185 190	
gtg gac cgg act gat gct cag tct agg cac cac gcg gct ggc aac gtt	624
Val Asp Arg Thr Asp Ala Gln Ser Arg His His Ala Ala Gly Asn Val	
195 200 205	
cgg cga agg gct gtg gac aat atg tgg tcc cac gtc atg ttg ttc ccg	672
Arg Arg Arg Ala Val Asp Asn Met Trp Ser His Val Met Leu Phe Pro	
210 215 220	
cag ggc act acc acc aat ggc aga gca ata atc gcc ttc aaa aca gga	720
Gln Gly Thr Thr Asn Gly Arg Ala Ile Ile Ala Phe Lys Thr Gly	
225 230 235 240	
gca ttt tcg cct ggt ctc cct gtg cag cca atg gtt att aga tac cct	768
Ala Phe Ser Pro Gly Leu Pro Val Gln Pro Met Val Ile Arg Tyr Pro	
245 250 255	
cac aag tat gtc aac ccc tct tgg tgt gac caa gga ggt ccg ttg gtc	816

His Lys Tyr Val Asn Pro Ser Trp Cys Asp Gln Gly Gly Pro Leu Val	260	265	270	
gtt gtg ttg cag ctg atg act cag ttc atc aac cac atg gag gtt gaa				864
Val Val Leu Gln Leu Met Thr Gln Phe Ile Asn His Met Glu Val Glu	275	280	285	
tat ttg ccg gtc atg aag cca act gtg aga gag atg aaa tac cct cat				912
Tyr Leu Pro Val Met Lys Pro Thr Val Arg Glu Met Lys Tyr Pro His	290	295	300	
gaa ttc gca agt aga gtt cgc agc gag atg gct aaa gcg tta ggc atc				960
Glu Phe Ala Ser Arg Val Arg Ser Glu Met Ala Lys Ala Leu Gly Ile	305	310	315	
gtg tgc aca gaa cac agc ttt ctg gat att aag cta gcg ctg gct gca				1008
Val Cys Thr Glu His Ser Phe Leu Asp Ile Lys Leu Ala Leu Ala Ala	325	330	335	
gaa aag ctc aaa cag cct tca ggt cgg tcg ttg gtt gag ttt gct cgc				1056
Glu Lys Leu Lys Gln Pro Ser Gly Arg Ser Leu Val Glu Phe Ala Arg	340	345	350	
atg gag aag tta ttt cgg ctg gat ttt cct acg gcg aag gaa tac ttg				1104
Met Glu Lys Leu Phe Arg Leu Asp Phe Pro Thr Ala Lys Glu Tyr Leu	355	360	365	
gaa aag ttc agc gcc atg gac cgc aca cac agt ggc ttt gtt aca ttt				1152
Glu Lys Phe Ser Ala Met Asp Arg Thr His Ser Gly Phe Val Thr Phe	370	375	380	
gag gag tta tgt acg gca ctg gat ctt cca cgc tca cca att act aag				1200
Glu Glu Leu Cys Thr Ala Leu Asp Leu Pro Arg Ser Pro Ile Thr Lys	385	390	395	
cag gtg ttc aac ctt ttc gat aag gat ggg cat gga agc ata aac ttt				1248
Gln Val Phe Asn Leu Phe Asp Lys Asp Gly His Ser Ile Asn Phe	405	410	415	
cga gag ttt ttg gca ggg ctc gcc ttt gtg tcc agc cac aca tca ttt				1296
Arg Glu Phe Leu Ala Gly Leu Ala Phe Val Ser Ser His Thr Ser Phe	420	425	430	
tca agt aca atg gag gct gca ttt aaa gca tgt gat gtg aat ggc gat				1344
Ser Ser Thr Met Glu Ala Ala Phe Lys Ala Cys Asp Val Asn Gly Asp	435	440	445	
ggc act ctt tct cgt gat gaa gtg gag agg agt ttg ctt gat atc ttt				1392
Gly Thr Leu Ser Arg Asp Glu Val Glu Arg Ser Leu Leu Asp Ile Phe	450	455	460	
cca gag ctc cct cca ata acg gtg ttc aag ctt ttt gac acg tta gat				1440
Pro Glu Leu Pro Pro Ile Thr Val Phe Lys Leu Phe Asp Thr Leu Asp	465	470	475	
ata aat cat gat gag aaa atc acg tgg gag gag ttc agt agc ttt ctg				1488
Ile Asn His Asp Glu Lys Ile Ser Trp Glu Glu Phe Ser Ser Phe Leu	485	490	495	
cag cga aac cca gag tat ctg gcc atc att ata tat gcg cac cct act				1536
Gln Arg Asn Pro Glu Tyr Leu Ala Ile Ile Ile Tyr Ala His Pro Thr	500	505	510	
ctg ctg aag cca ccc aca tcg act agc tga				1566
Leu Leu Lys Pro Pro Thr Ser Thr Ser	515	520		

<210> 8

<211> 521

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens
<400> 8

Met Glu Ser Thr Ala Asp Val Gly Met Ser Asp Asp Asp Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Leu Asn Gly Leu Glu Thr Pro Leu Leu Ala Glu Phe Pro Leu Gly Glu
 20 25 30
 Arg Pro Thr Ile Gly Pro Glu Ala Pro Val Asn Pro Phe His Glu Pro
 35 40 45
 Asp Gly Gly Trp Lys Thr Asn Asn Glu Trp Asn Tyr Phe Gln Met Met
 50 55 60
 Lys Ser Ile Leu Leu Ile Pro Leu Leu Val Arg Leu Val Ser Met
 65 70 75 80
 Ile Thr Ile Val Ala Phe Gly Tyr Val Trp Ile Arg Ile Cys Leu Ile
 85 90 95
 Gly Val Thr Asp Pro Leu Phe Lys Pro Phe Asn Pro Cys Arg Arg Phe
 100 105 110
 Met Leu Trp Gly Ile Arg Leu Val Ala Arg Ala Val Met Phe Thr Met
 115 120 125
 Gly Tyr Tyr Tyr Ile Pro Ile Lys Gly Lys Pro Ala His Arg Ser Glu
 130 135 140
 Ala Pro Ile Ile Val Ser Asn His Ile Gly Phe Leu Asp Pro Ile Phe
 145 150 155 160
 Val Phe Tyr Arg His Leu Pro Ala Ile Val Ser Ala Lys Glu Asn Val
 165 170 175
 Glu Met Pro Ile Ile Gly Leu Phe Leu Gln Ala Leu Gln Ile Ile Pro
 180 185 190
 Val Asp Arg Thr Asp Ala Gln Ser Arg His His Ala Ala Gly Asn Val
 195 200 205
 Arg Arg Arg Ala Val Asp Asn Met Trp Ser His Val Met Leu Phe Pro
 210 215 220
 Gln Gly Thr Thr Asn Gly Arg Ala Ile Ile Ala Phe Lys Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Phe Ser Pro Gly Leu Pro Val Gln Pro Met Val Ile Arg Tyr Pro
 245 250 255
 His Lys Tyr Val Asn Pro Ser Trp Cys Asp Gln Gly Gly Pro Leu Val
 260 265 270
 Val Val Leu Gln Leu Met Thr Gln Phe Ile Asn His Met Glu Val Glu
 275 280 285
 Tyr Leu Pro Val Met Lys Pro Thr Val Arg Glu Met Lys Tyr Pro His
 290 295 300
 Glu Phe Ala Ser Arg Val Arg Ser Glu Met Ala Lys Ala Leu Gly Ile
 305 310 315 320
 Val Cys Thr Glu His Ser Phe Leu Asp Ile Lys Leu Ala Leu Ala Ala
 325 330 335
 Glu Lys Leu Lys Gln Pro Ser Gly Arg Ser Leu Val Glu Phe Ala Arg
 340 345 350
 Met Glu Lys Leu Phe Arg Leu Asp Phe Pro Thr Ala Lys Glu Tyr Leu
 355 360 365
 Glu Lys Phe Ser Ala Met Asp Arg Thr His Ser Gly Phe Val Thr Phe
 370 375 380
 Glu Glu Leu Cys Thr Ala Leu Asp Leu Pro Arg Ser Pro Ile Thr Lys

10

385	390	395	400
Gln Val Phe Asn Leu Phe Asp Lys Asp Gly His Gly Ser Ile Asn Phe			
405	410	415	
Arg Glu Phe Leu Ala Gly Leu Ala Phe Val Ser Ser His Thr Ser Phe			
420	425	430	
Ser Ser Thr Met Glu Ala Ala Phe Lys Ala Cys Asp Val Asn Gly Asp			
435	440	445	
Gly Thr Leu Ser Arg Asp Glu Val Glu Arg Ser Leu Leu Asp Ile Phe			
450	455	460	
Pro Glu Leu Pro Pro Ile Thr Val Phe Lys Leu Phe Asp Thr Leu Asp			
465	470	475	480
Ile Asn His Asp Glu Lys Ile Ser Trp Glu Glu Phe Ser Ser Phe Leu			
485	490	495	
Gln Arg Asn Pro Glu Tyr Leu Ala Ile Ile Ile Tyr Ala His Pro Thr			
500	505	510	
Leu Leu Lys Pro Pro Thr Ser Thr Ser			
515	520		

<210> 9

<211> 2217

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (281)..(1837)

<223> LPAAT2

<400> 9

ggcgcgccag	aggacgagac	aaggggggcg	ctgtggactt	ggtacaactc	caaatgtggc	60
tctgaatcat	caactaaggg	tatggttata	caaagtgcgt	gccgcgaag	agacagacct	120
tcttggttac	ccaaagactga	atgaagatgg	gaagtggAAC	gatagtatga	tggctcagag	180
acgagtggct	ccgagttttt	tggtaactcag	taggaagttg	caagtgggtt	ttgcattgttg	240
aagaatcgac	actgcacagg	cctcaccatc	gacggatagc	atg acc agc	acg gaa	295
				Met Thr Ser Thr	Glu	
				1	5	
aat act gcg	atg ttc aca	gaa gac	act agc	act cta aac	ggc tcc aca	343
Asn Thr Ala	Met Phe Thr	Glu Asp Thr	Ser Thr	Leu Asn Gly	Ser Thr	
10	15	20				
gag gca aat cat	gct gag ttt	cct ctt gga	gag cgg	ccg acg	ata ggg	391
Glu Ala Asn His	Ala Glu Phe	Pro Leu Gly	Glu Arg Pro	Thr Ile Gly		
25	30	35				
ccg gag cca cca	gtg aac ccc	ttc cac gag	tcc agc	acg tgg	agc atc	439
Pro Glu Pro Pro	Val Asn Pro	Phe His Glu	Ser Ser	Thr Trp	Ser Ile	
40	45	50				
ccc caa gtg atc	aag acc att	ctg cta gtc	ccc ttg	ctc gtc	ata cgc	487
Pro Gln Val Ile	Lys Thr Ile	Leu Val Pro	Leu Leu Val	Ile Val Ile	Arg	
55	60	65				
ttg ctc agc atg	ttc gct ctc	atg atg	ttg ggc	tac ata	tgc gtc aag	535
Leu Leu Ser Met	Phe Ala Leu	Met Met	Leu Gly	Tyr Ile	Cys Val Lys	

70	75	80	85	
gtc gct atg atc gga tgc aaa gac ccg ttg ttc aag cct ttc aat cct				583
Val Ala Met Ile Gly Cys Lys Asp Pro Leu Phe Lys Pro Phe Asn Pro				
90	95	100		
ttg cgg cga ctc ttg ttg gta agt gtg agg tta ata gca aga ggg gtg				631
Leu Arg Arg Leu Leu Val Ser Val Arg Leu Ile Ala Arg Gly Val				
105	110	115		
atg gtg gcc atg ggg tat tac tat atc ctc gtc aag gga aaa cca gcc				679
Met Val Ala Met Gly Tyr Tyr Ile Leu Val Lys Gly Lys Pro Ala				
120	125	130		
cac cgg tct gtg gcg ccc att atc gta tcc aac cac atc ggc ttt gtg				727
His Arg Ser Val Ala Pro Ile Ile Val Ser Asn His Ile Gly Phe Val				
135	140	145		
gat ccc att ttt gtg ttc tat agg cac ttg ccg gtc atc gtc tca gcc				775
Asp Pro Ile Phe Val Phe Tyr Arg His Leu Pro Val Ile Val Ser Ala				
150	155	160	165	
aag gaa att gtg gag atg ccc ata atc gga atg ttc tta caa gct ctg				823
Lys Glu Ile Val Glu Met Pro Ile Ile Gly Met Phe Leu Gln Ala Leu				
170	175	180		
cag atc ata cct gtg gac cga ata aac ccc gcg tcc agg cac cat gcg				871
Gln Ile Ile Pro Val Asp Arg Ile Asn Pro Ala Ser Arg His His Ala				
185	190	195		
gct gga aat atc cga cga aga gct atg gac aac gag tgg ccg cat gtc				919
Ala Gly Asn Ile Arg Arg Ala Met Asp Asn Glu Trp Pro His Val				
200	205	210		
atg ctg ttt cca gag ggg act acc aca aat ggc aaa gcg ttg atc tcc				967
Met Leu Phe Pro Glu Gly Thr Thr Asn Gly Lys Ala Leu Ile Ser				
215	220	225		
ttc aaa aca gga gca ttt tcg cct ggt cta cct gtc caa ccc atg gtc				1015
Phe Lys Thr Gly Ala Phe Ser Pro Gly Leu Pro Val Gln Pro Met Val				
230	235	240	245	
att aaa tac ccc cac aag tat gtg aat ccg tgt tgg tgt aac caa ggg				1063
Ile Lys Tyr Pro His Lys Tyr Val Asn Pro Cys Trp Cys Asn Gln Gly				
250	255	260		
ggg cca ttg gtc att ctc ttt cag ctg atg act cag ttt gta aat tac				1111
Gly Pro Leu Val Ile Leu Phe Gln Leu Met Thr Gln Phe Val Asn Tyr				
265	270	275		
atg gag gtg gag tat ttg cct gtg atg acg cca aat gtg cat gag att				1159
Met Glu Val Glu Tyr Leu Pro Val Met Thr Pro Asn Val His Glu Ile				
280	285	290		
aaa aat ccc cat gaa ttt gct aat aga gta cgg act gag atg gcc aaa				1207
Lys Asn Pro His Glu Phe Ala Asn Arg Val Arg Thr Glu Met Ala Lys				
295	300	305		
gcg ctg ggc gtt gtg tgc acg gaa cat aac ttt cta gat atc aaa cta				1255
Ala Leu Gly Val Val Cys Thr Glu His Asn Phe Leu Asp Ile Lys Leu				
310	315	320	325	
aaa atg gct gca gag aag ctc aag cag cct tca gga cgc tca ttg gtt				1303
Lys Met Ala Ala Glu Lys Leu Lys Gln Pro Ser Gly Arg Ser Leu Val				
330	335	340		
gaa ttc gca cgc atg gag aag ctt ttt cga ctg gac tat tcc aag gcc				1351
Glu Phe Ala Arg Met Glu Lys Leu Phe Arg Leu Asp Tyr Ser Lys Ala				
345	350	355		
cag gaa tac ttg gaa aaa ttc agt gct atg gat cct tca cac agt ggt				1399
Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Phe Ser Ala Met Asp Pro Ser His Ser Gly				

12

360	365	370														
tat gtc aca tac gat gag ttc ctt aaa gca ctc cat ctt ccg ccc acc			1447													
Tyr	Val	Thr	Tyr	Asp	Glu	Phe	Leu	Lys	Ala	Leu	His	Leu	Pro	Pro	Thr	
375																
cag atc act gag cag gtg ttc aac ctt ttc gac aag aac gga cac ggt			1495													
Gln	Ile	Thr	Glu	Gln	Val	Phe	Asn	Leu	Phe	Asp	Lys	Asn	Gly	His	Gly	
390																
tct ata aac ttt cga gag ttt gtg gca ggg ctt gct ttc ctg tct acc			1543													
Ser	Ile	Asn	Phe	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Leu	Ser	Thr	
410																
cac act tca ttc cag act aca atg aag gct gca ttc aaa gct tgt gat			1591													
His	Thr	Ser	Phe	Gln	Thr	Thr	Met	Lys	Ala	Ala	Phe	Lys	Ala	Cys	Asp	
425																
gtg gat ggc gat ggc acc ctc act cgt aat gag gtg gaa agc agc ttg			1639													
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Thr	Leu	Thr	Arg	Asn	Glu	Val	Glu	Ser	Ser	Leu	
440																
atg gcc gta ttc ccg gag ctc ccc cca gca acg gtg tta aaa ctt ttc			1687													
Met	Ala	Val	Phe	Pro	Glu	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr	Val	Leu	Lys	Leu	Phe	
455																
gac acg ctg gat tta aat cgt gac ggg agc att aac tgg gag gag ttc			1735													
Asp	Thr	Leu	Asp	Leu	Asn	Arg	Asp	Gly	Ser	Ile	Asn	Trp	Glu	Glu	Phe	
470																
agc agc ttt ctg caa cga aat cct gag tat ttg gcc atc ata ttg gct			1783													
Ser	Ser	Phe	Leu	Gln	Arg	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ile	Ile	Leu	Ala	
490																
gca cac cct act ctg ttg cag gca cca aag tcg gaa gag agt gaa act			1831													
Ala	His	Pro	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Lys	Ser	Glu	Glu	Ser	Glu	Thr	
505																
aac atc tagagttctg tcaatcgata tctattagat catctcttc acatgctgtg			1887													
Asn	Ile															
ggaccttttggagctgcaat tcctcgagca tgatataacc actctattac agttgcgcctt			1947													
agtgggtgca tcttctggat ttgaatcgac tcggggacat aaaaggcagca gtgggttgcct			2007													
gtcaccgttg acatggttta ggaacttagc atcgagatag atccttactt gagatcattt			2067													
tgtatttcca cagactatttgcgttaccag tagctctgct agagctagaa ttctatgat			2127													
gtggacgaaa gtcacttat tcttaagaat caaaaagttaa gctccggct ttgtaacgtt			2187													
tttactgcaa aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa			2217													

<210> 10

<211> 519

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 10

Met	Thr	Ser	Thr	Glu	Asn	Thr	Ala	Met	Phe	Thr	Glu	Asp	Thr	Ser	Thr	
1				5				10				15				
Leu	Asn	Gly	Ser	Thr	Glu	Ala	Asn	His	Ala	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Glu	
20								25				30				
Arg	Pro	Thr	Ile	Gly	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Asn	Pro	Phe	His	Glu	Ser	
35									40			45				
Ser	Thr	Trp	Ser	Ile	Pro	Gln	Val	Ile	Lys	Thr	Ile	Leu	Leu	Val	Pro	

50	55	60													
Leu	Leu	Val	Ile	Arg	Leu	Leu	Ser	Met	Phe	Ala	Leu	Met	Met	Leu	Gly
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Val	Lys	Val	Ala	Met	Ile	Gly	Cys	Lys	Asp	Pro	Leu	Phe
															85
Lys	Pro	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Val	Ser	Val	Arg	Leu
															90
Ile	Ala	Arg	Gly	Val	Met	Val	Ala	Met	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Val
															95
115						120									125
Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	His	Arg	Ser	Val	Ala	Pro	Ile	Ile	Val	Ser	Asn
130						135									140
His	Ile	Gly	Phe	Val	Asp	Pro	Ile	Phe	Val	Phe	Tyr	Arg	His	Leu	Pro
145						150					155				160
Val	Ile	Val	Ser	Ala	Lys	Glu	Ile	Val	Glu	Met	Pro	Ile	Ile	Gly	Met
															165
Phe	Leu	Gln	Ala	Leu	Gln	Ile	Ile	Pro	Val	Asp	Arg	Ile	Asn	Pro	Ala
															180
Ser	Arg	His	His	Ala	Ala	Gly	Asn	Ile	Arg	Arg	Arg	Ala	Met	Asp	Asn
															195
Glu	Trp	Pro	His	Val	Met	Leu	Phe	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Thr	Asn	Gly
						210			215						220
Lys	Ala	Leu	Ile	Ser	Phe	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	Pro
225						230					235				240
Val	Gln	Pro	Met	Val	Ile	Lys	Tyr	Pro	His	Lys	Tyr	Val	Asn	Pro	Cys
						245					250				255
Trp	Cys	Asn	Gln	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Ile	Leu	Phe	Gln	Leu	Met	Thr
						260			265						270
Gln	Phe	Val	Asn	Tyr	Met	Glu	Val	Glu	Tyr	Leu	Pro	Val	Met	Thr	Pro
						275			280						285
Asn	Val	His	Glu	Ile	Lys	Asn	Pro	His	Glu	Phe	Ala	Asn	Arg	Val	Arg
						290			295						300
Thr	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Leu	Gly	Val	Val	Cys	Thr	Glu	His	Asn	Phe
305						310					315				320
Leu	Asp	Ile	Lys	Leu	Lys	Met	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Gln	Pro	Ser
						325					330				335
Gly	Arg	Ser	Leu	Val	Glu	Phe	Ala	Arg	Met	Glu	Lys	Leu	Phe	Arg	Leu
						340			345						350
Asp	Tyr	Ser	Lys	Ala	Gln	Glu	Tyr	Leu	Glu	Lys	Phe	Ser	Ala	Met	Asp
						355			360						365
Pro	Ser	His	Ser	Gly	Tyr	Val	Thr	Tyr	Asp	Glu	Phe	Leu	Lys	Ala	Leu
						370			375						380
His	Leu	Pro	Pro	Thr	Gln	Ile	Thr	Glu	Gln	Val	Phe	Asn	Leu	Phe	Asp
385						390					395				400
Lys	Asn	Gly	His	Gly	Ser	Ile	Asn	Phe	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Gly	Leu
						405					410				415
Ala	Phe	Leu	Ser	Thr	His	Thr	Ser	Phe	Gln	Thr	Thr	Met	Lys	Ala	Ala
						420			425						430
Phe	Lys	Ala	Cys	Asp	Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Thr	Leu	Thr	Arg	Asn	Glu
						435			440						445
Val	Glu	Ser	Ser	Leu	Met	Ala	Val	Phe	Pro	Glu	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr
						450			455						460
Val	Leu	Lys	Leu	Phe	Asp	Thr	Leu	Asp	Leu	Asn	Arg	Asp	Gly	Ser	Ile
465						470					475				480
Asn	Trp	Glu	Glu	Phe	Ser	Ser	Phe	Leu	Gln	Arg	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu

14

485	490	495
Ala Ile Ile Leu Ala Ala His Pro Thr Leu Leu Gln Ala Pro Lys Ser		
500	505	510
Glu Glu Ser Glu Thr Asn Ile		
515		

<210> 11

<211> 1014

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1014)

<223> LPAAT

<400> 11

atg att atg atg gag gtg ctg tgg gag ctt ata tgg ctg ctg gat Met Ile Met Met Glu Val Leu Trp Ser Glu Leu Ile Trp Leu Leu Asp 1 5 10 15 tgg tgg gca aat gtg aag gtg aag gtt tac acg cca aag gag tcg tgg Trp Trp Ala Asn Val Lys Val Lys Val Tyr Thr Pro Lys Glu Ser Trp 20 25 30 gag cac tta gga aag gag cac gca tta ctc att tgt aat cac cgc agt Glu His Leu Gly Lys Glu His Ala Leu Leu Ile Cys Asn His Arg Ser 35 40 45 gac att gat tgg ctc gta gga tgg att att gcc cag aga ttg ggg tgt Asp Ile Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Ile Ala Gln Arg Leu Gly Cys 50 55 60 cta ggt ggg act cga gct gtt atg aag aag tcc acc aaa ttt ctt ccg Leu Gly Gly Thr Arg Ala Val Met Lys Lys Ser Thr Lys Phe Leu Pro 65 70 75 80 gtc att ggc tgg tct atg tgg ttt tca gag tat gtg ttt tta tca aga Val Ile Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Val Phe Leu Ser Arg 85 90 95 gat tgg gcc aaa gat gag aag gtc ttg aag aat ggt tat tca agt ctt Asp Trp Ala Lys Asp Glu Lys Val Leu Lys Asn Gly Tyr Ser Ser Leu 100 105 110 aag ggc ttc ccc agg acc ttg tgg gtg gct ctt ttt gtg gaa ggc act Lys Gly Phe Pro Arg Thr Leu Trp Val Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr 115 120 125 cga ttt acg aag gct aaa ctt gag gtt gcc caa aaa ttt gcg gcg gat Arg Phe Thr Lys Ala Lys Leu Glu Val Ala Gln Lys Phe Ala Ala Asp 130 135 140 aca ggg cta cgt gtt cca agg tat gtg ctt gtt cct cgc aca aaa ggg Thr Gly Leu Arg Val Pro Arg Tyr Val Leu Val Pro Arg Thr Lys Gly 145 150 155 160 ttc gtt tcg gct gtg gag aac ttg cgt gaa ttt gtt ccg gta gtt tat Phe Val Ser Ala Val Glu Asn Leu Arg Glu Phe Val Pro Val Val Tyr 165 170 175 gac atg acc gtt gct ata tct aaa gag ctg ccc aat cct aca atg atc	48 96 144 192 240 288 336 384 432 480 528 576
--	--

Asp Met Thr Val Ala Ile Ser Lys Glu Leu Pro Asn Pro Thr Met Ile			
180	185	190	
cgg att ttc aga ggg caa cca tct gtg gtt cat gtg tac gtg agg cgg		624	
Arg Ile Phe Arg Gly Gln Pro Ser Val Val His Val Tyr Val Arg Arg			
195	200	205	
gtc cct atg tct gat ctg cct gag gga gcc aac gcg att tct aaa tgg		672	
Val Pro Met Ser Asp Leu Pro Glu Gly Ala Asn Ala Ile Ser Lys Trp			
210	215	220	
tgt cac gat gcc ttt cac atc aag gac gat cgg ctg gag cag cac gaa		720	
Cys His Asp Ala Phe His Ile Lys Asp Asp Arg Leu Glu Gln His Glu			
225	230	235	240
aaa gag aat acg ttt ggg gag gac ttg tat att cct att gaa cgg cca		768	
Lys Glu Asn Thr Phe Gly Glu Asp Leu Tyr Ile Pro Ile Glu Arg Pro			
245	250	255	
ctt aaa cct ctt att att gtg atc tcc tgg gcc atc act ttg ctg gct		816	
Leu Lys Pro Leu Ile Ile Val Ile Ser Trp Ala Ile Thr Leu Leu Ala			
260	265	270	
gca gca tgg tgg ttt cta aga cga gtt tta tcc act tgg aaa gga atc		864	
Ala Ala Trp Trp Phe Leu Arg Arg Val Leu Ser Thr Trp Lys Gly Ile			
275	280	285	
gcc tgg gtg gca gga gta ctc gtg gtc atg ctg tgt gtc cag att		912	
Ala Trp Val Ala Gly Val Leu Val Val Val Met Leu Cys Val Gln Ile			
290	295	300	
tta gtg atg tcg tca caa tcg gaa aga agt tca gat cct gca gct aag		960	
Leu Val Met Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Ser Asp Pro Ala Ala Lys			
305	310	315	320
aag gcc aat caa aaa cag gcg gct tct gtt gct cac ctc ggc aaa acg		1008	
Lys Ala Asn Gln Lys Gln Ala Ala Ser Val Ala His Leu Gly Lys Thr			
325	330	335	
gac tga		1014	
Asp			

<210> 12

<211> 337

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 12

Met Ile Met Met Glu Val Leu Trp Ser Glu Leu Ile Trp Leu Leu Asp			
1	5	10	15
Trp Trp Ala Asn Val Lys Val Lys Val Tyr Thr Pro Lys Glu Ser Trp			
20	25	30	
Glu His Leu Gly Lys Glu His Ala Leu Leu Ile Cys Asn His Arg Ser			
35	40	45	
Asp Ile Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Ile Ala Gln Arg Leu Gly Cys			
50	55	60	
Leu Gly Gly Thr Arg Ala Val Met Lys Lys Ser Thr Lys Phe Leu Pro			
65	70	75	80
Val Ile Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Val Phe Leu Ser Arg			
85	90	95	
Asp Trp Ala Lys Asp Glu Lys Val Leu Lys Asn Gly Tyr Ser Ser Leu			

100	105	110
Lys Gly Phe Pro Arg Thr Leu Trp Val Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr		
115	120	125
Arg Phe Thr Lys Ala Lys Leu Glu Val Ala Gln Lys Phe Ala Ala Asp		
130	135	140
Thr Gly Leu Arg Val Pro Arg Tyr Val Leu Val Pro Arg Thr Lys Gly		
145	150	155
Phe Val Ser Ala Val Glu Asn Leu Arg Glu Phe Val Pro Val Val Tyr		
165	170	175
Asp Met Thr Val Ala Ile Ser Lys Glu Leu Pro Asn Pro Thr Met Ile		
180	185	190
Arg Ile Phe Arg Gly Gln Pro Ser Val Val His Val Tyr Val Arg Arg		
195	200	205
Val Pro Met Ser Asp Leu Pro Glu Gly Ala Asn Ala Ile Ser Lys Trp		
210	215	220
Cys His Asp Ala Phe His Ile Lys Asp Asp Arg Leu Glu Gln His Glu		
225	230	235
Lys Glu Asn Thr Phe Gly Glu Asp Leu Tyr Ile Pro Ile Glu Arg Pro		
245	250	255
Leu Lys Pro Leu Ile Ile Val Ile Ser Trp Ala Ile Thr Leu Leu Ala		
260	265	270
Ala Ala Trp Trp Phe Leu Arg Arg Val Leu Ser Thr Trp Lys Gly Ile		
275	280	285
Ala Trp Val Ala Gly Val Leu Val Val Val Met Leu Cys Val Gln Ile		
290	295	300
Leu Val Met Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Ser Asp Pro Ala Ala Lys		
305	310	315
Lys Ala Asn Gln Lys Gln Ala Ala Ser Val Ala His Leu Gly Lys Thr		
325	330	335
Asp		

<210> 13

<211> 643

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> misc_feature

<223> LPAAT2

<400> 13

-ggcgccgcccag	aggacgagac	aaggggagtc	aatttggaaatg	cctgaagacc	tgcattgaaac	60
tggtaaaaga	agggtgtct	gctctgtttt	tccctgaggg	cacaaggaca	acggatggag	120
caatggctgc	cttcaagaaa	ggagcttct	ctgtggcggc	caagggaggt	gtgtcagttg	180
tacctataac	gttaattggc	tcaggcaagt	tgatgccaaa	tggtttagaa	tatacattac	240
ggcctggcgt	tgtaaaaatg	attgtccacc	cagctatccg	cagtaaaaat	gccgatgagc	300
tttgtatca	gtcttaggaag	gttattgcag	agaccttgc	caaacacgggt	cttcctgttc	360
attagttgt	gtgattgtat	atccctatc	aggatgtgc	gatcaagtga	tcaagccctg	420
tttgcgttc	ttagtgatta	aggagtcatt	tctgtccatc	gtttatgccc	cgcaagagat	480
ttaaggagat	cacaaagtgc	gtttagcaa	gagagttgga	cactgtgata	agcccaatta	540
acttatgttgc	aagtgtcatt	tatttttgc	aaaaaaaaaa	aataaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	600

aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaagcggc cgc 643

<210> 14

<211> 657

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(657)

<223> LPAAT

<400> 14

atg ctg ata tta cag ccc ttc gta ctc tta ctc gac aag caa cgt aga 48
Met Leu Ile Leu Gln Pro Phe Val Leu Leu Leu Asp Lys Gln Arg Arg
1 5 10 15

aga gct cag cac ctt gtg aac aag gtg tgg gca att ttg aca acg tct 96
Arg Ala Gln His Leu Val Asn Lys Val Trp Ala Ile Leu Thr Thr Ser
20 25 30

ttg ttt tat aaa act gag att gaa ggt tgg gaa aat ctt cca gca tct 144
Leu Phe Tyr Lys Thr Glu Ile Glu Gly Trp Glu Asn Leu Pro Ala Ser
35 40 45

gat gag ggt gca gtg tat gtt gcc aat cat caa agc ttt ttg gac atc 192
Asp Glu Gly Ala Val Tyr Val Ala Asn His Gln Ser Phe Leu Asp Ile
50 55 60

tat aca ctc ttt caa tta gga cga cca ttt aag ttt att agc aag acc 240
Tyr Thr Leu Phe Gln Leu Gly Arg Pro Phe Lys Phe Ile Ser Lys Thr
65 70 75 80

agc aat ttt ctc att ccg att att ggt tgg tcc atg tac atg acg ggc 288
Ser Asn Phe Leu Ile Pro Ile Gly Trp Ser Met Tyr Met Thr Gly
85 90 95

cac att ccc cta aag cgt atg gac aag agg agt caa ttg gaa tgc ctg 336
His Ile Pro Leu Lys Arg Met Asp Lys Arg Ser Gln Leu Glu Cys Leu
100 105 110

aag acc tgc atg aag ctg gtt aaa gaa ggt gtg tct gtt ctg ttt ttc 384
Lys Thr Cys Met Lys Leu Val Lys Glu Gly Val Ser Val Leu Phe Phe
115 120 125

cct gag ggc aca agg aca acg gat gga gca atg gct gcc ttc aag aaa 432
Pro Glu Gly Thr Arg Thr Asp Gly Ala Met Ala Ala Phe Lys Lys
130 135 140

gga gct ttc tct gtg gcg gcc aag gga ggt gtg cca gtt gta cct ata 480
Gly Ala Phe Ser Val Ala Ala Lys Gly Gly Val Pro Val Val Pro Ile
145 150 155 160

acg tta att ggc tca ggc aag ttg atg cca aat ggt tta gaa tat aca 528
Thr Leu Ile Gly Ser Gly Lys Leu Met Pro Asn Gly Leu Glu Tyr Thr
165 170 175

tta cgg cct ggc gtt gtg aaa atg att gtc cac cca gct atc cgc agt 576
Leu Arg Pro Gly Val Val Lys Met Ile Val His Pro Ala Ile Arg Ser
180 185 190

aaa aat gcc gat gag ctt tgt gat cag tct agg aag gtt att gca gag 624
Lys Asn Ala Asp Glu Leu Cys Asp Gln Ser Arg Lys Val Ile Ala Glu
195 200 205

acc ttg atc caa cac ggt ctt cct gtt cat tag
 Thr Leu Ile Gln His Gly Leu Pro Val His
 210 215

657

<210> 15

<211> 218

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 15

Met Leu Ile Leu Gln Pro Phe Val Leu Leu Leu Asp Lys Gln Arg Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Gln His Leu Val Asn Lys Val Trp Ala Ile Leu Thr Thr Ser
 20 25 30
 Leu Phe Tyr Lys Thr Glu Ile Glu Gly Trp Glu Asn Leu Pro Ala Ser
 35 40 45
 Asp Glu Gly Ala Val Tyr Val Ala Asn His Gln Ser Phe Leu Asp Ile
 50 55 60
 Tyr Thr Leu Phe Gln Leu Gly Arg Pro Phe Lys Phe Ile Ser Lys Thr
 65 70 75 80
 Ser Asn Phe Leu Ile Pro Ile Ile Gly Trp Ser Met Tyr Met Thr Gly
 85 90 95
 His Ile Pro Leu Lys Arg Met Asp Lys Arg Ser Gln Leu Glu Cys Leu
 100 105 110
 Lys Thr Cys Met Lys Leu Val Lys Glu Gly Val Ser Val Leu Phe Phe
 115 120 125
 Pro Glu Gly Thr Arg Thr Thr Asp Gly Ala Met Ala Ala Phe Lys Lys
 130 135 140
 Gly Ala Phe Ser Val Ala Ala Lys Gly Gly Val Pro Val Val Pro Ile
 145 150 155 160
 Thr Leu Ile Gly Ser Gly Lys Leu Met Pro Asn Gly Leu Glu Tyr Thr
 165 170 175
 Leu Arg Pro Gly Val Val Lys Met Ile Val His Pro Ala Ile Arg Ser
 180 185 190
 Lys Asn Ala Asp Glu Leu Cys Asp Gln Ser Arg Lys Val Ile Ala Glu
 195 200 205
 Thr Leu Ile Gln His Gly Leu Pro Val His
 210 215

<210> 16

<211> 1254

<212> DNA

<213> *Mortierella alpina*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1251)

<223> LPAAT

<400> 16

atg gat gaa tcc acc acg acc acc acg cac cac tca gag acc agc agc	48
Met Asp Glu Ser Thr Thr Thr His His Ser Glu Thr Ser Ser	
1 5 10 15	
aag acg tcc tcg cac ccc cgc cgg ctc ggt ccc gag atg aac cct atc	96
Lys Thr Ser Ser His Pro Arg Arg Leu Gly Pro Glu Met Asn Pro Ile	
20 25 30	
tac aag ggt ctg cga gcc att gtc tgg gcc ttt tac ttc aac ctg gga	144
Tyr Lys Gly Leu Arg Ala Ile Val Trp Ala Phe Tyr Phe Asn Leu Gly	
35 40 45	
gcg tcg ctt ata tcg atc acg cag gtg ctg tcg cct ctg gcg ttg	192
Ala Ser Leu Ile Ser Ile Thr Gln Val Leu Ser Leu Pro Leu Ala Leu	
50 55 60	
att gct cca ggg gtc tac cag tgg cac atc agc aaa aca cag ggt cac	240
Ile Ala Pro Gly Val Tyr Gln Trp His Ile Ser Lys Thr Gln Gly His	
65 70 75 80	
ttt gga gct ttc ctg ctc cgg atg aac cag ctc ttt gcg ccg tca gat	288
Phe Gly Ala Phe Leu Leu Arg Met Asn Gln Leu Phe Ala Pro Ser Asp	
85 90 95	
att gtc ttg aca ggg gac gag agt gtc agg gga atc gtc aag gtc tac	336
Ile Val Leu Thr Gly Asp Glu Ser Val Arg Gly Ile Val Lys Val Tyr	
100 105 110	
aaa gga cgg aac ctg aag gag gcc ggt gag cca ggc agc ggt cag gga	384
Lys Gly Arg Asn Leu Lys Glu Ala Gly Glu Pro Gly Ser Gly Gln Gly	
115 120 125	
gag gac att ctt ctg gat atg ccc gag agg atg gtt ttc att gcg aac	432
Glu Asp Ile Leu Leu Asp Met Pro Glu Arg Met Val Phe Ile Ala Asn	
130 135 140	
cac cag atc tac tct gac tgg atg tac ctc tgg tgc ttc tcc tat ttt	480
His Gln Ile Tyr Ser Asp Trp Met Tyr Leu Trp Cys Phe Ser Tyr Phe	
145 150 155 160	
gca gag agg cac agg gca ctg aag att att ctt cgg ggc gac ctg acc	528
Ala Glu Arg His Ala Leu Lys Ile Ile Leu Arg Gly Asp Leu Thr	
165 170 175	
tgg atc cct gtc ttt ggc tgg ggt atg cgg ttc ttt gac ttt atc ttt	576
Trp Ile Pro Val Phe Gly Trp Gly Met Arg Phe Phe Asp Phe Ile Phe	
180 185 190	
ttg aaa cgt aat gac tgg gca cac gat cgc cgt gcc att gag gaa aac	624
Leu Lys Arg Asn Asp Trp Ala His Asp Arg Arg Ala Ile Glu Glu Asn	
195 200 205	
ttg gga cgt gtc aag gaa aag gat ccc ctc tgg ctc gtg gtc ttc ccc	672
Leu Gly Arg Val Lys Glu Lys Asp Pro Leu Trp Leu Val Val Phe Pro	
210 215 220	
gag gga aca gtc gtc tcc aag gaa acg cgt ctc cga tcc gtt gcc ttt	720
Glu Gly Thr Val Val Ser Lys Glu Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Phe	
225 230 235 240	
tca aag aag gct agt ctg tcg gat cac cgc cat gtg ctg ctt cca agg	768
Ser Lys Lys Ala Ser Leu Ser Asp His Arg His Val Leu Leu Pro Arg	
245 250 255	
acc agc ggt ctg ttt gtg tgc atc aac aag ttg cgt gga tct gtc gac	816
Thr Ser Gly Leu Phe Val Cys Ile Asn Lys Leu Arg Gly Ser Val Asp	
260 265 270	
tac ttg tac gat gca acc gtt ggc tac tcg aat gtc gag tat ggc gag	864
Tyr Leu Tyr Asp Ala Thr Val Gly Tyr Ser Asn Val Glu Tyr Gly Glu	

20

275	280	285	
att ccg cag gag ctt tac ccg tta cca gga ctg tat atc aac aaa gca			912
Ile Pro Gln Glu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Leu Tyr Ile Asn Lys Ala			
290	295	300	
cag ccc aag gag atc aac atg cac ctg cgt cga ttt gcg atc aag gat			960
Gln Pro Lys Glu Ile Asn Met His Leu Arg Arg Phe Ala Ile Lys Asp			
305	310	315	320
atc ccc acg tca gaa ccc gaa ttt gtg gaa tgg gtc cga gct cgg tgg			1008
Ile Pro Thr Ser Glu Pro Glu Phe Val Glu Trp Val Arg Ala Arg Trp			
325	330	335	
gtg gag aag gat gag ttg atg gaa gag ttt tat acc aag ggc cga ttt			
Val Glu Lys Asp Glu Leu Met Glu Glu Phe Tyr Thr Lys Gly Arg Phe			
340	345	350	
cca tca caa ctg acg gcc gac att ggt gag aag gag gtc aag acg			1104
Pro Ser Gln Leu Thr Ala Ala Asp Ile Gly Glu Lys Glu Val Lys Thr			
355	360	365	
gca gga ggt cca acg gag gga cag agt gtc agg atc ccg ctc aag gcg			1152
Ala Gly Gly Pro Thr Glu Gly Gln Ser Val Arg Ile Pro Leu Lys Ala			
370	375	380	
cga ggc atg atg gac tac ctc atg ccc tcg gtc atg aat ctg atc gcc			1200
Arg Gly Met Met Asp Tyr Leu Met Pro Ser Val Met Asn Leu Ile Ala			
385	390	395	400
ctt cct gtg ctg gcg ttt gcg atg aga tat gca gtg cag caa gca tcg			1248
Leu Pro Val Leu Ala Phe Ala Met Arg Tyr Ala Val Gln Gln Ala Ser			
405	410	415	
ggc tga			1254
Gly			

<210> 17

<211> 417

<212> PRT

<213> Mortierella alpina

<400> 17

Met Asp Glu Ser Thr Thr Thr His His Ser Glu Thr Ser Ser			
1	5	10	15
Lys Thr Ser Ser His Pro Arg Arg Leu Gly Pro Glu Met Asn Pro Ile			
20	25	30	
Tyr Lys Gly Leu Arg Ala Ile Val Trp Ala Phe Tyr Phe Asn Leu Gly			
35	40	45	
Ala Ser Leu Ile Ser Ile Thr Gln Val Leu Ser Leu Pro Leu Ala Leu			
50	55	60	
Ile Ala Pro Gly Val Tyr Gln Trp His Ile Ser Lys Thr Gln Gly His			
65	70	75	80
Phe Gly Ala Phe Leu Leu Arg Met Asn Gln Leu Phe Ala Pro Ser Asp			
85	90	95	
Ile Val Leu Thr Gly Asp Glu Ser Val Arg Gly Ile Val Lys Val Tyr			
100	105	110	
Lys Gly Arg Asn Leu Lys Glu Ala Gly Glu Pro Gly Ser Gly Gln Gly			
115	120	125	
Glu Asp Ile Leu Leu Asp Met Pro Glu Arg Met Val Phe Ile Ala Asn			

21

130	135	140
His Gln Ile Tyr Ser Asp Trp Met Tyr Leu Trp Cys Phe Ser Tyr Phe		
145	150	155
Ala Glu Arg His Arg Ala Leu Lys Ile Ile Leu Arg Gly Asp Leu Thr		160
165	170	175
Trp Ile Pro Val Phe Gly Trp Gly Met Arg Phe Phe Asp Phe Ile Phe		
180	185	190
Leu Lys Arg Asn Asp Trp Ala His Asp Arg Arg Ala Ile Glu Glu Asn		
195	200	205
Leu Gly Arg Val Lys Glu Lys Asp Pro Leu Trp Leu Val Val Phe Pro		
210	215	220
Glu Gly Thr Val Val Ser Lys Glu Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Phe		
225	230	235
Ser Lys Lys Ala Ser Leu Ser Asp His Arg His Val Leu Leu Pro Arg		240
245	250	255
Thr Ser Gly Leu Phe Val Cys Ile Asn Lys Leu Arg Gly Ser Val Asp		
260	265	270
Tyr Leu Tyr Asp Ala Thr Val Gly Tyr Ser Asn Val Glu Tyr Gly Glu		
275	280	285
Ile Pro Gln Glu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Leu Tyr Ile Asn Lys Ala		
290	295	300
Gln Pro Lys Glu Ile Asn Met His Leu Arg Arg Phe Ala Ile Lys Asp		
305	310	315
Ile Pro Thr Ser Glu Pro Glu Phe Val Glu Trp Val Arg Ala Arg Trp		320
325	330	335
Val Glu Lys Asp Glu Leu Met Glu Glu Phe Tyr Thr Lys Gly Arg Phe		
340	345	350
Pro Ser Gln Leu Thr Ala Ala Asp Ile Gly Glu Lys Glu Val Lys Thr		
355	360	365
Ala Gly Gly Pro Thr Glu Gly Gln Ser Val Arg Ile Pro Leu Lys Ala		
370	375	380
Arg Gly Met Met Asp Tyr Leu Met Pro Ser Val Met Asn Leu Ile Ala		
385	390	395
Leu Pro Val Leu Ala Phe Ala Met Arg Tyr Ala Val Gln Gln Ala Ser		400
405	410	415
Gly		

<210> 18

<211> 1170

<212> DNA

<213> Mortierella alpina

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1167)

<223> LPAAT

<400> 18

atg aac cct atc tac aag ggt ctg cga gcc att gtc tgg gcc ttt tac	48
Met Asn Pro Ile Tyr Lys Gly Leu Arg Ala Ile Val Trp Ala Phe Tyr	
1 5 10 15	
ttc aac ctg gga gcg tcg ctt ata tcg atc acg cag gtg ctg tcg ctg	96

22

Phe Asn Leu Gly Ala Ser Leu Ile Ser Ile Thr Gln Val Leu Ser Leu			
20	25	30	
cct ctg gcg ttg att gct cca ggg gtc tac cag tgg cac atc agc aaa		144	
Pro Leu Ala Leu Ile Ala Pro Gly Val Tyr Gln Trp His Ile Ser Lys			
35	40	45	
aca cag ggt cac ttt gga gct ttc ctg ctc cggt aat cag ctc ttt		192	
Thr Gln Gly His Phe Gly Ala Phe Leu Leu Arg Met Asn Gln Leu Phe			
50	55	60	
gct ccg tca gat att gtc ttg aca ggg gac gag agt gtc agg gga atc		240	
Ala Pro Ser Asp Ile Val Leu Thr Gly Asp Glu Ser Val Arg Gly Ile			
65	70	75	80
gtc aag gtc tac aaa gga cgg aac ctg aag gag gcc ggt gag cca ggc		288	
Val Lys Val Tyr Lys Gly Arg Asn Leu Lys Glu Ala Gly Glu Pro Gly			
85	90	95	
agc ggt cag gga gag gac att ctt ctg gat atg ccc gag agg atg gtt		336	
Ser Gly Gln Gly Glu Asp Ile Leu Leu Asp Met Pro Glu Arg Met Val			
100	105	110	
ttc att gcg aac cac cag atc tac tct gac ttg atg tac ctc tgg tgc		384	
Phe Ile Ala Asn His Gln Ile Tyr Ser Asp Trp Met Tyr Leu Trp Cys			
115	120	125	
ttc tcc tat ttt gca gag agg cac agg gca ctg aag att att ctt cgg		432	
Phe Ser Tyr Phe Ala Glu Arg His Arg Ala Leu Lys Ile Ile Leu Arg			
130	135	140	
ggc gac ctg acc ttg atc cct gtc ttt ggc ttgg ggt atg cgg ttc ttg		480	
Gly Asp Leu Thr Trp Ile Pro Val Phe Gly Trp Gly Met Arg Phe Phe			
145	150	155	160
gac ttg atc ttg ttg aaa cgt aat gac ttg gca cac gat cgc cgt ggc		528	
Asp Phe Ile Phe Leu Lys Arg Asn Asp Trp Ala His Asp Arg Arg Ala			
165	170	175	
att gag gaa aac ttg gga cgt gtc aag gaa aag gat ccc ctc tgg ctc		576	
Ile Glu Glu Asn Leu Gly Arg Val Lys Glu Lys Asp Pro Leu Trp Leu			
180	185	190	
gtg gtc ttc ccc gag gga aca gtc gtc tcc aag gaa acg cgt ctc cga		624	
Val Val Phe Pro Glu Gly Thr Val Val Ser Lys Glu Thr Arg Leu Arg			
195	200	205	
tcc gtt gcc ttt tca aag aag gct agt ctg tcg gat cac cgc cat gtg		672	
Ser Val Ala Phe Ser Lys Lys Ala Ser Leu Ser Asp His Arg His Val			
210	215	220	
ctg ctt cca agg acc agc ggt ctg ttt gtg tgc atc aac aag ttg cgt		720	
Leu Leu Pro Arg Thr Ser Gly Leu Phe Val Cys Ile Asn Lys Leu Arg			
225	230	235	240
gga tct gtc gac tac ttg tac gat gca acc gtt ggc tac tcg aat gtc		768	
Gly Ser Val Asp Tyr Leu Tyr Asp Ala Thr Val Gly Tyr Ser Asn Val			
245	250	255	
gag tat ggc gag att ccg cag gag ctt tac ccg tta cca gga ctg tat		816	
Glu Tyr Gly Glu Ile Pro Gln Glu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Leu Tyr			
260	265	270	
atc aac aaa gca cag ccc aag gag atc aac atg cac ctg cgt cga ttt		864	
Ile Asn Lys Ala Gln Pro Lys Glu Ile Asn Met His Leu Arg Arg Phe			
275	280	285	
gct atc aag gat atc ccc acg tca gaa ccc gaa ttt gtg gaa ttg gtc		912	
Ala Ile Lys Asp Ile Pro Thr Ser Glu Pro Glu Phe Val Glu Trp Val			
290	295	300	
cga gct cgg tgg gtg gag aag gat gag ttg atg gaa gag ttt tat acc		960	

23

Arg Ala Arg Trp Val Glu Lys Asp Glu Leu Met Glu Glu Phe Tyr Thr
 305 310 315 320
 aag ggc cga ttt cca tca caa ctg acg gcc gac att ggt gag aag 1008
 Lys Gly Arg Phe Pro Ser Gln Leu Thr Ala Ala Asp Ile Gly Glu Lys
 325 330 335
 gag gtc aag acg gca gga ggt cca acg gag gga cag agt gtc agg atc 1056
 Glu Val Lys Thr Ala Gly Gly Pro Thr Glu Gly Gln Ser Val Arg Ile
 340 345 350
 ccg ctc aag gcg cga ggc atg atg gac tac ctc atg ccc tcg gtc atg 1104
 Pro Leu Lys Ala Arg Gly Met Met Asp Tyr Leu Met Pro Ser Val Met
 355 360 365
 aat ctg atc gcc ctt cct gtg ctg gcg ttt gcg atg aga tat gca gtg 1152
 Asn Leu Ile Ala Leu Pro Val Leu Ala Phe Ala Met Arg Tyr Ala Val
 370 375 380
 cag caa gca tcg ggc tga
 Gln Gln Ala Ser Gly 1170
 385

<210> 19

<211> 389

<212> PRT

<213> Mortierella alpina

<400> 19

Met Asn Pro Ile Tyr Lys Gly Leu Arg Ala Ile Val Trp Ala Phe Tyr
 1 5 10 15
 Phe Asn Leu Gly Ala Ser Leu Ile Ser Ile Thr Gln Val Leu Ser Leu
 20 25 30
 Pro Leu Ala Leu Ile Ala Pro Gly Val Tyr Gln Trp His Ile Ser Lys
 35 40 45
 Thr Gln Gly His Phe Gly Ala Phe Leu Leu Arg Met Asn Gln Leu Phe
 50 55 60
 Ala Pro Ser Asp Ile Val Leu Thr Gly Asp Glu Ser Val Arg Gly Ile
 65 70 75 80
 Val Lys Val Tyr Lys Gly Arg Asn Leu Lys Glu Ala Gly Glu Pro Gly
 85 90 95
 Ser Gly Gln Gly Glu Asp Ile Leu Leu Asp Met Pro Glu Arg Met Val
 100 105 110
 Phe Ile Ala Asn His Gln Ile Tyr Ser Asp Trp Met Tyr Leu Trp Cys
 115 120 125
 Phe Ser Tyr Phe Ala Glu Arg His Arg Ala Leu Lys Ile Ile Leu Arg
 130 135 140
 Gly Asp Leu Thr Trp Ile Pro Val Phe Gly Trp Gly Met Arg Phe Phe
 145 150 155 160
 Asp Phe Ile Phe Leu Lys Arg Asn Asp Trp Ala His Asp Arg Arg Ala
 165 170 175
 Ile Glu Glu Asn Leu Gly Arg Val Lys Glu Lys Asp Pro Leu Trp Leu
 180 185 190
 Val Val Phe Pro Glu Gly Thr Val Val Ser Lys Glu Thr Arg Leu Arg
 195 200 205
 Ser Val Ala Phe Ser Lys Lys Ala Ser Leu Ser Asp His Arg His Val
 210 215 220

24

Leu Leu Pro Arg Thr Ser Gly Leu Phe Val Cys Ile Asn Lys Leu Arg
 225 230 235 240
 Gly Ser Val Asp Tyr Leu Tyr Asp Ala Thr Val Gly Tyr Ser Asn Val
 245 250 255
 Glu Tyr Gly Glu Ile Pro Gln Glu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Leu Tyr
 260 265 270
 Ile Asn Lys Ala Gln Pro Lys Glu Ile Asn Met His Leu Arg Arg Phe
 275 280 285
 Ala Ile Lys Asp Ile Pro Thr Ser Glu Pro Glu Phe Val Glu Trp Val
 290 295 300
 Arg Ala Arg Trp Val Glu Lys Asp Glu Leu Met Glu Glu Phe Tyr Thr
 305 310 315 320
 Lys Gly Arg Phe Pro Ser Gln Leu Thr Ala Ala Asp Ile Gly Glu Lys
 325 330 335
 Glu Val Lys Thr Ala Gly Gly Pro Thr Glu Gly Gln Ser Val Arg Ile
 340 345 350
 Pro Leu Lys Ala Arg Gly Met Met Asp Tyr Leu Met Pro Ser Val Met
 355 360 365
 Asn Leu Ile Ala Leu Pro Val Leu Ala Phe Ala Met Arg Tyr Ala Val
 370 375 380
 Gln Gln Ala Ser Gly
 385

<210> 20

<211> 687

<212> DNA

<213> Shewanella hanedai

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(684)

<223> LPAAT

<400> 20

atg tta ctg cta gca ttt gtt ttt ggt ggt ctt gtt ttt ttt tta tta aga	48
Met Leu Leu Leu Ala Phe Val Phe Gly Gly Leu Val Cys Leu Leu Arg	
1 5 10 15	
ccg aga cat cgt gac aat gta cac atg ttc gct aaa att ttc tcc tat	96
Pro Arg His Arg Asp Asn Val His Met Phe Ala Lys Ile Phe Ser Tyr	
20 25 30	
gct gcg cca gta tta ggt atc aag gtc ata gta cgt aaa cct agc gta	144
Ala Ala Pro Val Leu Gly Ile Lys Val Ile Val Arg Lys Pro Ser Val	
35 40 45	
gcg acg act gag cct tgt gtc ttt ttg gca aat cat cag aat aat ttc	192
Ala Thr Thr Glu Pro Cys Val Phe Leu Ala Asn His Gln Asn Asn Phe	
50 55 60	
gat atg ttt acc cat act gcg gca gta ccg aaa ggg acg gtc agt ctt	240
Asp Met Phe Thr His Thr Ala Ala Val Pro Lys Gly Thr Val Ser Leu	
65 70 75 80	
gga aag aag agt tta gct tgg gtg cct ttt ttt ggt cag att tac tgg	288
Gly Lys Lys Ser Leu Ala Trp Val Pro Phe Phe Gly Gln Ile Tyr Trp	
85 90 95	

ttg tcc ggt aat att cta att gac aga aaa aac cgc aat aga gcg ttt	336
Leu Ser Gly Asn Ile Leu Ile Asp Arg Lys Asn Arg Asn Arg Ala Phe	
100 105 110	
gaa acc atg gcg caa acc gcc aaa aag att aaa gat aag tgc tta tct	384
Glu Thr Met Ala Gln Thr Ala Lys Lys Ile Lys Asp Lys Cys Leu Ser	
115 120 125	
atc tgg ata ttt ccg gaa ggt acg cgc tct cgt ggc aag ggc tta ttg	432
Ile Trp Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Gly Lys Gly Leu Leu	
130 135 140	
cct ttt aaa tct ggt gca ttt cat act gca ata gat gcg gga gtg gct	480
Pro Phe Lys Ser Gly Ala Phe His Thr Ala Ile Asp Ala Gly Val Ala	
145 150 155 160	
atg gta cct gtg ttg gca tca aat caa agc cat ata aaa ctt aat cgt	528
Met Val Pro Val Leu Ala Ser Asn Gln Ser His Ile Lys Leu Asn Arg	
165 170 175	
tgg aat aat ggt gtg gtt att atc gag atg atg gat cca atc gaa act	576
Trp Asn Asn Gly Val Val Ile Ile Glu Met Met Asp Pro Ile Glu Thr	
180 185 190	
aaa ggt ttg gct aag tct cag gta aag gag ttg tct aaa cgt atc cac	624
Lys Gly Leu Ala Lys Ser Gln Val Lys Glu Leu Ser Lys Arg Ile His	
195 200 205	
gct atg atg tcg aat cgt tta act cag ttg gat caa gaa gct tca gcc	672
Ala Met Met Ser Asn Arg Leu Thr Gln Leu Asp Gln Glu Ala Ser Ala	
210 215 220	
tta atg gca aag taa	687
Leu Met Ala Lys	
225	

<210> 21

<211> 228

<212> PRT

<213> Shewanella hanedai

<400> 21

Met Leu Leu Leu Ala Phe Val Phe Gly Gly Leu Val Cys Leu Leu Arg	
1 5 10 15	
Pro Arg His Arg Asp Asn Val His Met Phe Ala Lys Ile Phe Ser Tyr	
20 25 30	
Ala Ala Pro Val Leu Gly Ile Lys Val Ile Val Arg Lys Pro Ser Val	
35 40 45	
Ala Thr Thr Glu Pro Cys Val Phe Leu Ala Asn His Gln Asn Asn Phe	
50 55 60	
Asp Met Phe Thr His Thr Ala Ala Val Pro Lys Gly Thr Val Ser Leu	
65 70 75 80	
Gly Lys Lys Ser Leu Ala Trp Val Pro Phe Phe Gly Gln Ile Tyr Trp	
85 90 95	
Leu Ser Gly Asn Ile Leu Ile Asp Arg Lys Asn Arg Asn Arg Ala Phe	
100 105 110	
Glu Thr Met Ala Gln Thr Ala Lys Lys Ile Lys Asp Lys Cys Leu Ser	
115 120 125	
Ile Trp Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Gly Lys Gly Leu Leu	
130 135 140	

Pro Phe Lys Ser Gly Ala Phe His Thr Ala Ile Asp Ala Gly Val Ala
 145 150 155 160
 Met Val Pro Val Leu Ala Ser Asn Gln Ser His Ile Lys Leu Asn Arg
 165 170 175
 Trp Asn Asn Gly Val Val Ile Ile Glu Met Met Asp Pro Ile Glu Thr
 180 185 190
 Lys Gly Leu Ala Lys Ser Gln Val Lys Glu Leu Ser Lys Arg Ile His
 195 200 205
 Ala Met Met Ser Asn Arg Leu Thr Gln Leu Asp Gln Glu Ala Ser Ala
 210 215 220
 Leu Met Ala Lys
 225

<210> 22

<211> 1352

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (39)...(1340)

<223> GPAT

<400> 22

ggccgcaagg taaccgcctt ctgccgcaag cttgact atg ccg tcg ctg ttt cgg 56
 Met Pro Ser Leu Phe Arg
 1 5
 gcg aaa cgc aat ggc aga agg acg ccg ggg aat gcc gtg acc aat ttc 104
 Ala Lys Arg Asn Gly Arg Arg Thr Pro Gly Asn Ala Val Thr Asn Phe
 10 15 20
 ggg aaa tct gaa ttc cat cgt gaa att agt ggg agt acg cgg gcg acc 152
 Gly Lys Ser Glu Phe His Arg Glu Ile Ser Gly Ser Thr Arg Ala Thr
 25 30 35
 acg cag gtg gct gaa gcc acc aca gct ggt ctt agg gag acc att gag 200
 Thr Gln Val Ala Glu Ala Thr Thr Ala Gly Leu Arg Glu Thr Ile Glu
 40 45 50
 gac cgc gct att atc gac ggt cat tct cac agt ttt gaa gga att caa 248
 Asp Arg Ala Ile Ile Asp Gly His Ser His Ser Phe Glu Gly Ile Gln
 55 60 65 70
 tcg gaa gaa gag ttg atg cag gta att gaa aag gag gtg gaa tcc ggt 296
 Ser Glu Glu Leu Met Gln Val Ile Glu Lys Glu Val Glu Ser Gly
 75 80 85
 cgg ctg ccg aag cgt gct ggc gcg gga atg gta gag ttg tat cgc aat 344
 Arg Leu Pro Lys Arg Ala Gly Ala Gly Met Val Glu Leu Tyr Arg Asn
 90 95 100
 tat cga gat gct gta gtg agc agt ggc gta gaa aat gcg atg gat att 392
 Tyr Arg Asp Ala Val Val Ser Ser Gly Val Glu Asn Ala Met Asp Ile
 105 110 115
 gtt gtg aaa gtc atg tca act gtg ttg gac cgg att ctt ctg cag ttc 440
 Val Val Lys Val Met Ser Thr Val Leu Asp Arg Ile Leu Leu Gln Phe
 120 125 130
 gag gag cca ttc aca ttt gga tcg cac cac aag aga atg gtg gag ccg 488

Glu	Glu	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	His	His	Lys	Arg	Met	Val	Glu	Pro	
135																150
tat	gat	tac	tac	aca	ttt	ggt	cag	aac	tat	gtg	cgt	cct	ctc	cta	gat	536
Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Asn	Tyr	Val	Arg	Pro	Leu	Leu	Asp	
155															165	
ttc	agg	aac	tct	tac	ctt	ggg	aac	tta	aag	atc	ttt	gac	cag	ata	gag	584
Phe	Arg	Asn	Ser	Tyr	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Ile	Phe	Asp	Gln	Ile	Glu	
170															180	
aag	aac	ctg	aaa	gag	ggg	cac	aac	gtc	att	ttt	cta	tcc	aat	cac	cag	632
Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Asn	Val	Ile	Phe	Leu	Ser	Asn	His	Gln	
185															195	
act	gag	gca	gat	cct	gct	gtt	atg	gcg	ctg	ttg	ctt	gag	cac	tct	cac	680
Thr	Glu	Ala	Asp	Pro	Ala	Val	Met	Ala	Leu	Leu	Leu	Glu	His	Ser	His	
200															210	
ccc	tat	ttg	gca	gag	aac	ttg	acc	tat	gtg	gct	gga	gac	agg	gtt	gtg	728
Pro	Tyr	Leu	Ala	Glu	Asn	Leu	Thr	Tyr	Val	Ala	Gly	Asp	Arg	Val	Val	
215															220	
ctg	gat	cca	ttc	tgc	aaa	cct	ttt	agt	atg	ggc	agg	aat	ctc	ttg	tgc	776
Leu	Asp	Pro	Phe	Cys	Lys	Pro	Phe	Ser	Met	Gly	Arg	Asn	Leu	Leu	Cys	
235															240	
gtg	tat	tca	aaa	aag	cac	att	cac	gat	gtt	ccg	gac	ctt	gct	gaa	atg	824
Val	Tyr	Ser	Lys	Lys	His	Ile	His	Asp	Val	Pro	Asp	Leu	Ala	Glu	Met	
250															255	
aaa	atc	aaa	gct	aat	gcg	aag	act	ttg	aga	cag	atg	acg	atc	ctg	ctg	872
Lys	Ile	Lys	Ala	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Arg	Gln	Met	Thr	Ile	Leu	Leu	
265															270	
agg	cag	gga	ggt	caa	tta	tta	tgg	gtt	gca	ccc	agt	ggt	gga	cgc	gat	920
Arg	Gln	Gly	Gly	Gln	Leu	Leu	Trp	Val	Ala	Pro	Ser	Gly	Gly	Arg	Asp	
280															285	
cgc	cct	gat	cct	gag	acc	aac	gaa	tgg	gtt	cct	gca	cat	ttt	gac	tcg	968
Arg	Pro	Asp	Pro	Glu	Thr	Asn	Glu	Trp	Val	Pro	Ala	His	Phe	Asp	Ser	
295															300	
tct	gct	gtg	gag	aat	atg	aag	cga	cta	tct	gac	att	gtc	cga	gta	cct	1016
Ser	Ala	Val	Glu	Asn	Met	Lys	Arg	Leu	Ser	Asp	Ile	Val	Arg	Val	Pro	
315															320	
gct	cat	tta	cat	gcc	cta	tca	tta	cta	tgt	ttt	gag	att	atg	cca	cct	1064
Ala	His	Leu	His	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Cys	Phe	Glu	Ile	Met	Pro	Pro	
330															335	
cct	gtc	cag	gta	caa	aag	gag	cta	gga	gag	cga	aga	gca	gta	gga	ttt	1112
Pro	Val	Gln	Val	Gln	Lys	Glu	Leu	Gly	Glu	Arg	Arg	Ala	Val	Gly	Phe	
345															350	
agc	gga	gtt	ggt	cta	gcc	gtt	tcc	gag	caa	cta	gat	tat	gat	tcc	att	1160
Ser	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Glu	Gln	Leu	Asp	Tyr	Asp	Ser	Ile	
360															365	
gcg	aag	tta	gtc	gac	gat	tcc	aaa	aat	gct	aag	gat	gcc	ttt	tcg	gat	1208
Ala	Lys	Leu	Val	Asp	Ser	Lys	Asn	Ala	Lys	Asp	Ala	Phe	Ser	Asp		
375															380	
gct	gca	tgg	agc	gaa	gtc	aat	gat	atg	tat	aac	gtg	tta	aaa	gaa	gca	1256
Ala	Ala	Trp	Ser	Glu	Val	Asn	Asp	Met	Tyr	Asn	Val	Leu	Lys	Glu	Ala	
395															400	
att	tat	ggt	gac	caa	ggt	tgt	gct	gtt	agc	aca	gat	tcc	ttg	aga	ctg	1304
Ile	Tyr	Gly	Asp	Gln	Gly	Cys	Ala	Val	Ser	Thr	Asp	Ser	Leu	Arg	Leu	
410															415	
gaa	cag	ccc	tgg	ttt	gat	gga	agc	agg	cga	act	gat	tgaaaatagg	gc		1352	

Glu Gln Pro Trp Phe Asp Gly Ser Arg Arg Thr Asp
 425 430

<210> 23

<211> 434

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 23

Met Pro Ser Leu Phe Arg Ala Lys Arg Asn Gly Arg Arg Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asn Ala Val Thr Asn Phe Gly Lys Ser Glu Phe His Arg Glu Ile Ser
 20 25 30
 Gly Ser Thr Arg Ala Thr Thr Gln Val Ala Glu Ala Thr Thr Ala Gly
 35 40 45
 Leu Arg Glu Thr Ile Glu Asp Arg Ala Ile Ile Asp Gly His Ser His
 50 55 60
 Ser Phe Glu Gly Ile Gln Ser Glu Glu Glu Leu Met Gln Val Ile Glu
 65 70 75 80
 Lys Glu Val Glu Ser Gly Arg Leu Pro Lys Arg Ala Gly Ala Gly Met
 85 90 95
 Val Glu Leu Tyr Arg Asn Tyr Arg Asp Ala Val Val Ser Ser Gly Val
 100 105 110
 Glu Asn Ala Met Asp Ile Val Val Lys Val Met Ser Thr Val Leu Asp
 115 120 125
 Arg Ile Leu Leu Gln Phe Glu Glu Pro Phe Thr Phe Gly Ser His His
 130 135 140
 Lys Arg Met Val Glu Pro Tyr Asp Tyr Tyr Thr Phe Gly Gln Asn Tyr
 145 150 155 160
 Val Arg Pro Leu Leu Asp Phe Arg Asn Ser Tyr Leu Gly Asn Leu Lys
 165 170 175
 Ile Phe Asp Gln Ile Glu Lys Asn Leu Lys Glu Gly His Asn Val Ile
 180 185 190
 Phe Leu Ser Asn His Gln Thr Glu Ala Asp Pro Ala Val Met Ala Leu
 195 200 205
 Leu Leu Glu His Ser His Pro Tyr Leu Ala Glu Asn Leu Thr Tyr Val
 210 215 220
 Ala Gly Asp Arg Val Val Leu Asp Pro Phe Cys Lys Pro Phe Ser Met
 225 230 235 240
 Gly Arg Asn Leu Leu Cys Val Tyr Ser Lys Lys His Ile His Asp Val
 245 250 255
 Pro Asp Leu Ala Glu Met Lys Ile Lys Ala Asn Ala Lys Thr Leu Arg
 260 265 270
 Gln Met Thr Ile Leu Leu Arg Gln Gly Gly Gln Leu Leu Trp Val Ala
 275 280 285
 Pro Ser Gly Gly Arg Asp Arg Pro Asp Pro Glu Thr Asn Glu Trp Val
 290 295 300
 Pro Ala His Phe Asp Ser Ser Ala Val Glu Asn Met Lys Arg Leu Ser
 305 310 315 320
 Asp Ile Val Arg Val Pro Ala His Leu His Ala Leu Ser Leu Leu Cys
 325 330 335
 Phe Glu Ile Met Pro Pro Pro Val Gln Val Gln Lys Glu Leu Gly Glu

340	345	350
Arg Arg Ala Val Gly Phe Ser Gly Val Gly Leu Ala Val Ser Glu Gln		
355	360	365
Leu Asp Tyr Asp Ser Ile Ala Lys Leu Val Asp Asp Ser Lys Asn Ala		
370	375	380
Lys Asp Ala Phe Ser Asp Ala Ala Trp Ser Glu Val Asn Asp Met Tyr		
385	390	395
Asn Val Leu Lys Glu Ala Ile Tyr Gly Asp Gln Gly Cys Ala Val Ser		400
405	410	415
Thr Asp Ser Leu Arg Leu Glu Gln Pro Trp Phe Asp Gly Ser Arg Arg		
420	425	430
Thr Asp		

<210> 24

<211> 444

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(444)

<223> GPAT/LPAAT

<400> 24

atg atc cgg att ttc aga ggg caa cca tct gtg gtt cat gtg cac gtg	48		
Met Ile Arg Ile Phe Arg Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Val			
1	5	10	15
agg cgg gtc cct atg tct gat ctg cct gag gga gcc aac gcg att tct			
Arg Arg Val Pro Met Ser Asp Leu Pro Glu Gly Ala Asn Ala Ile Ser			
20	25	30	
aaa tgg tgt cac gat gcc ttt cac atc aag gac gat cgg ctg gag cag			
Lys Trp Cys His Asp Ala Phe His Ile Lys Asp Asp Arg Leu Glu Gln			
35	40	45	
cac gaa aaa gag aat acg ttt ggg gag gac ttg tat att cct att gaa			
His Glu Lys Glu Asn Thr Phe Gly Glu Asp Leu Tyr Ile Pro Ile Glu			
50	55	60	
cgg cca ctt aaa cct ctt att att gtg atc tcc tgg gcc atc act ttg			
Arg Pro Leu Lys Pro Leu Ile Ile Val Ile Ser Trp Ala Ile Thr Leu			
65	70	75	80
ctg gct gca gca tgg tgg ttt cta aga cga gtt tta tcc act tgg aaa			
Leu Ala Ala Ala Trp Trp Phe Leu Arg Arg Val Leu Ser Thr Trp Lys			
85	90	95	
gga atc gcc tgg gtg gca gga gta ctc gtg gtc atg ctg tgt gtc			
Gly Ile Ala Trp Val Ala Gly Val Leu Val Val Met Leu Cys Val			
100	105	110	
cag att tta gtg atg tcg tca caa tcg gaa aga agt tca gat cct gca			
Gln Ile Leu Val Met Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Ser Asp Pro Ala			
115	120	125	
gct aag aag gcc aat caa aaa cag gcg gct tct gtt gct cac ctc ggc			
Ala Lys Lys Ala Asn Gln Lys Gln Ala Ala Ser Val Ala His Leu Gly			
130	135	140	

aaa acg gac tga
 Lys Thr Asp
 145

444

<210> 25

<211> 147
 <212> PRT
 <213> *Physcomitrella patens*

<400> 25

Met Ile Arg Ile Phe Arg Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Val
 1 5 10 15
 Arg Arg Val Pro Met Ser Asp Leu Pro Glu Gly Ala Asn Ala Ile Ser
 20 25 30
 Lys Trp Cys His Asp Ala Phe His Ile Lys Asp Asp Arg Leu Glu Gln
 35 40 45
 His Glu Lys Glu Asn Thr Phe Gly Glu Asp Leu Tyr Ile Pro Ile Glu
 50 55 60
 Arg Pro Leu Lys Pro Leu Ile Ile Val Ile Ser Trp Ala Ile Thr Leu
 65 70 75 80
 Leu Ala Ala Ala Trp Trp Phe Leu Arg Arg Val Leu Ser Thr Trp Lys
 85 90 95
 Gly Ile Ala Trp Val Ala Gly Val Leu Val Val Val Met Leu Cys Val
 100 105 110
 Gln Ile Leu Val Met Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Ser Asp Pro Ala
 115 120 125
 Ala Lys Lys Ala Asn Gln Lys Gln Ala Ala Ser Val Ala His Leu Gly
 130 135 140
 Lys Thr Asp
 145

<210> 26

<211> 1710
 <212> DNA
 <213> *Physcomitrella patens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (246)...(1394)
 <223> GPAT/LPAAT

<400> 26

gaattcgccc tttctctttt tcgtgctgct ccagccgata ttcatgaccc tccccgggcag 60
 gtcacattgc gtgttggcca tgcctgggtt gcaagctctcg tgaccctcac gctcgcgcgac 120
 ggcaccgctc gtcttctgcc tcttgcttgc tcttgcttgc tttctgagga acagccccag 180
 ctccggcacc agcataaggt cgtgttaggga gagagagaga gggggagaga agtaagctt 240
 gagtc atg gag ggc ggg tcc ata atc gct ctt cct ctg ggg ctt atg 290
 Met Glu Gly Gly Ser Ile Ile Ala Leu Pro Leu Gly Leu Met
 1 5 10 15
 ttc ctc ttc tcc ggg ttc ttt atc aat atc ctg cag ctg ctg tcg gtg 338

31

Phe	Leu	Phe	Ser	Gly	Phe	Phe	Ile	Asn	Ile	Leu	Gln	Leu	Leu	Ser	Val		
20					25					30							
tta	ttc	att	ttg	ccg	ttt	tcg	agg	agg	gcg	tac	cga	gta	gtg	aat	atg	386	
Leu	Phe	Ile	Leu	Pro	Phe	Ser	Arg	Arg	Ala	Tyr	Arg	Val	Val	Asn	Met		
35					40					45							
att	atg	atg	gag	gtg	ctg	tgg	tcg	gag	ctt	ata	tgg	ctg	ctg	gat	tgg	434	
Ile	Met	Met	Glu	Val	Leu	Trp	Ser	Glu	Leu	Ile	Trp	Leu	Leu	Asp	Trp		
50			55					60									
tgg	gcg	aat	gtg	aag	gtg	aag	gtt	tac	acg	cca	aag	gag	tcg	tgg	gag	482	
Trp	Ala	Asn	Val	Lys	Val	Lys	Val	Tyr	Thr	Pro	Lys	Glu	Ser	Trp	Glu		
65			70					75									
cac	tta	gga	aag	gag	cac	gca	tta	ctc	att	tgt	aat	cac	cgc	agt	gac	530	
His	Leu	Gly	Lys	Glu	His	Ala	Leu	Leu	Ile	Cys	Asn	His	Arg	Ser	Asp		
80			85					90				95					
ata	gat	tgg	ctc	gta	gga	tgg	att	att	gcc	cag	aga	ttg	ggg	tgt	cta	578	
Ile	Asp	Trp	Leu	Val	Gly	Trp	Ile	Ile	Ala	Gln	Arg	Leu	Gly	Cys	Leu		
100			105					110									
ggg	ggg	act	cga	gct	gtt	atg	aag	aag	tcc	acc	aaa	ttt	ctt	ccg	gtc	626	
Gly	Gly	Thr	Arg	Ala	Val	Met	Lys	Lys	Ser	Thr	Lys	Phe	Leu	Pro	Val		
115			120					125									
att	ggc	tgg	tct	atg	tgg	ttt	tca	gag	tat	gtg	ttt	tta	tca	aga	gat	674	
Ile	Gly	Trp	Ser	Met	Trp	Phe	Ser	Glu	Tyr	Val	Phe	Leu	Ser	Arg	Asp		
130			135					140									
tgg	gcc	aaa	gat	gag	aag	gtc	ttg	aag	aat	ggt	tat	tca	agt	ctt	aag	722	
Trp	Ala	Lys	Asp	Glu	Lys	Val	Leu	Lys	Asn	Gly	Tyr	Ser	Ser	Leu	Lys		
145			150					155									
ggc	ttc	ccc	agg	acc	ttg	tgg	gtg	gct	ctt	ttt	gtg	gaa	ggc	act	cga	770	
Gly	Phe	Pro	Arg	Thr	Leu	Trp	Val	Ala	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Thr	Arg		
160			165					170				175					
ttt	acg	aag	gcc	aaa	ctt	gag	gct	gcc	caa	aaa	ttt	gca	gcg	gat	aca	818	
Phe	Thr	Lys	Ala	Lys	Leu	Glu	Ala	Ala	Gln	Lys	Phe	Ala	Ala	Asp	Thr		
180			185					190									
ggg	cta	cgt	gtt	cca	agg	cat	gtg	ctt	gtt	cct	ccg	aca	aaa	ggg	tcc	866	
Gly	Leu	Arg	Val	Pro	Arg	His	Val	Leu	Val	Pro	Arg	Thr	Lys	Gly	Phe		
195			200					205									
gtt	tgc	gtc	gtg	gag	aac	ttg	cgt	gaa	ttt	gtt	ccg	gta	gtt	tat	gac	914	
Val	Ser	Ala	Val	Glu	Asn	Leu	Arg	Glu	Phe	Val	Pro	Val	Val	Tyr	Asp		
210			215					220									
atg	acc	gtt	gct	ata	tct	aaa	gag	ctg	ccc	aat	cct	aca	ata	atc	cgg	962	
Met	Thr	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Glu	Leu	Pro	Asn	Pro	Thr	Met	Ile	Arg		
225			230					235									
att	ttc	aga	ggg	caa	cca	tct	gtg	gtt	cat	gtg	cac	gtg	aga	cgg	gtc	1010	
Ile	Phe	Arg	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Val	His	Val	His	Val	Arg	Arg	Val		
240			245					250				255					
cct	atg	tct	gat	ctg	cct	gag	gga	gcc	aac	gcc	att	tct	aaa	tgg	tgt	1058	
Pro	Met	Ser	Asp	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Asn	Ala	Ile	Ser	Lys	Trp	Cys		
260			265					270									
cac	gat	gcc	ttt	cac	atc	aag	gac	gat	cggt	ctg	gag	cag	cac	gaa	aaa	1106	
His	Asp	Ala	Phe	His	Ile	Lys	Asp	Asp	Arg	Leu	Glu	Gln	His	Glu	Lys		
275			280					285									
gag	aat	acg	ttt	ggg	gag	gac	ttg	tat	att	cct	att	gaa	cggt	ccat	ttt	1154	
Glu	Asn	Thr	Phe	Gly	Glu	Asp	Leu	Tyr	Ile	Pro	Ile	Glu	Arg	Pro	Leu		
290			295					300									
aaa	cct	ctt	att	att	gtg	atc	tcc	tgg	gcc	atc	act	ttg	ctg	gct	gca	1202	

32

Lys Pro Leu Ile Ile Val Ile Ser Trp Ala Ile Thr Leu Leu Ala Ala			
305	310	315	
gca tgg tgg ttt cta aga cga gtt tta tcc act tgg aaa gga atc gcc			1250
Ala Trp Trp Phe Leu Arg Arg Val Leu Ser Thr Trp Lys Gly Ile Ala			
320	325	330	335
tgg gtg gca gga gta ctc gtg gtc atg ctg tgt gtc cag att tta			
Trp Val Ala Gly Val Leu Val Val Met Leu Cys Val Gln Ile Leu			
340	345	350	
gtg atg tcg tca caa tcg gaa aga agt tca gat cct gca gct aag aag			1346
Val Met Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Ser Asp Pro Ala Ala Lys Lys			
355	360	365	
gcc aat caa aaa cag gcg gct tct gtt gct cac ctc ggc aaa acg gac			1394
Ala Asn Gln Gln Ala Ala Ser Val Ala His Leu Gly Lys Thr Asp			
370	375	380	
tgagaacttt tgcttaacg caatccaaga cttaggcggt ctagtctcag ttacaattag			1454
cattcaggca ctccagatgt gtcaagaaat tttagttact ctggcaaga attgtttgac			1514
acctttagt ccacctaatt tccttgaacg attaagagca gcggccatta gatgattcga			1574
tttggtttct tgatagtatc tggcaccc tc ttctcaagc attgtgtatt ccgcattcagc			1634
cattcctttt ttaagatgt attgcttctc gttcgagggt aggtcatttc tgatctaatt			1694
ttgaaagcac taattc			1710

<210> 27

<211> 383

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 27

Met Glu Gly Gly Ser Ile Ile Ala Leu Pro Leu Gly Leu Met Phe			
1	5	10	15
Leu Phe Ser Gly Phe Phe Ile Asn Ile Leu Gln Leu Leu Ser Val Leu			
20	25	30	
Phe Ile Leu Pro Phe Ser Arg Arg Ala Tyr Arg Val Val Asn Met Ile			
35	40	45	
Met Met Glu Val Leu Trp Ser Glu Leu Ile Trp Leu Leu Asp Trp Trp			
50	55	60	
Ala Asn Val Lys Val Lys Val Tyr Thr Pro Lys Glu Ser Trp Glu His			
65	70	75	80
Leu Gly Lys Glu His Ala Leu Leu Ile Cys Asn His Arg Ser Asp Ile			
85	90	95	
Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Ile Ala Gln Arg Leu Gly Cys Leu Gly			
100	105	110	
Gly Thr Arg Ala Val Met Lys Lys Ser Thr Lys Phe Leu Pro Val Ile			
115	120	125	
Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Val Phe Leu Ser Arg Asp Trp			
130	135	140	
Ala Lys Asp Glu Lys Val Leu Lys Asn Gly Tyr Ser Ser Leu Lys Gly			
145	150	155	160
Phe Pro Arg Thr Leu Trp Val Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe			
165	170	175	
Thr Lys Ala Lys Leu Glu Ala Ala Gln Lys Phe Ala Ala Asp Thr Gly			
180	185	190	
Leu Arg Val Pro Arg His Val Leu Val Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val			

195	200	205
Ser Ala Val Glu Asn Leu Arg Glu Phe Val Pro Val Val Tyr Asp Met		
210	215	220
Thr Val Ala Ile Ser Lys Glu Leu Pro Asn Pro Thr Met Ile Arg Ile		
225	230	235
Phe Arg Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Val Arg Arg Val Pro		240
245	250	255
Met Ser Asp Leu Pro Glu Gly Ala Asn Ala Ile Ser Lys Trp Cys His		
260	265	270
Asp Ala Phe His Ile Lys Asp Asp Arg Leu Glu Gln His Glu Lys Glu		
275	280	285
Asn Thr Phe Gly Glu Asp Leu Tyr Ile Pro Ile Glu Arg Pro Leu Lys		
290	295	300
Pro Leu Ile Ile Val Ile Ser Trp Ala Ile Thr Leu Leu Ala Ala Ala		
305	310	315
Trp Trp Phe Leu Arg Arg Val Leu Ser Thr Trp Lys Gly Ile Ala Trp		320
325	330	335
Val Ala Gly Val Leu Val Val Val Met Leu Cys Val Gln Ile Leu Val		
340	345	350
Met Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Ser Asp Pro Ala Ala Lys Lys Ala		
355	360	365
Asn Gln Lys Gln Ala Ala Ser Val Ala His Leu Gly Lys Thr Asp		
370	375	380

<210> 28

<211> 628

<212> DNA

<213> Cryptocodinium cohnii

<220>

<221> CDS

<222> (3)...(578)

<223> DAGAT

<400> 28

tt gat gat tgg atc gcc gcg ttg gcg act gct tgt gca agc acg gat	47
Asp Asp Trp Ile Ala Ala Leu Ala Thr Ala Cys Ala Ser Thr Asp	
1 5 10 15	
ggg gtt acg gac gtc gac agc ctg aag ccc tca gca agt gca gtt ccc	95
Gly Val Thr Asp Val Asp Ser Leu Lys Pro Ser Ala Ser Ala Val Pro	
20 25 30	
cat gga ccc ccc aag gcg aag gtc agt gag cta tcg gcc ctg cgc aag	143
His Gly Pro Pro Lys Ala Lys Val Ser Glu Leu Ser Ala Leu Arg Lys	
35 40 45	
gtg cac aat cga aac cgg acc agc gtt ttg acc aac gag gac gga ggc	191
Val His Asn Arg Asn Arg Thr Ser Val Leu Thr Asn Glu Asp Gly Gly	
50 55 60	
att cct gag tgc aac gtt gtg ggg atc gtg aac ctc tgt gtt act gtg	239
Ile Pro Glu Cys Asn Val Val Gly Ile Val Asn Leu Cys Val Thr Val	
65 70 75	
atg gtc ttg atc cac ctg cgc ctc att tat gag agc atc cgg aag cac	287
Met Val Leu Ile His Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Ser Ile Arg Lys His	

80	85	90	95	
ggt gtt ttg gac acc ttc cgg gtg gcg gcc cac acc gca ctc aag				335
Gly Val Leu Leu Asp Thr Phe Arg Val Ala Ala His Thr Ala Leu Lys				
100	105	110		
cca ggt aac ttc cag tgt acg ctt tgt ttc gct ttg ccg gtc ctg				383
Pro Gly Asn Phe Gln Cys Thr Leu Cys Phe Phe Ala Leu Pro Val Leu				
115	120	125		
gcc atc ttg gcg acc ttc att gag gtc ttg gcg agc aag gga cag ttg				431
Ala Ile Leu Ala Thr Phe Ile Glu Val Leu Ala Ser Lys Gly Gln Leu				
130	135	140		
ggg atc tcg ctt cgc gag cac cct gca tgc cgg gct ttg tac aat ctg				479
Gly Ile Ser Leu Arg Glu His Pro Ala Cys Arg Ala Leu Tyr Asn Leu				
145	150	155		
cct tac cat ccc tgt cct ggt cat cca cca ctt tca ggc aac tcc tct				527
Pro Tyr His Pro Cys Pro Gly His Pro Pro Leu Ser Gly Asn Ser Ser				
160	165	170	175	
cgt ggg agc ctc gtt gct gat tgc tgc gac cac tct ctt ctt gaa agt				575
Arg Gly Ser Leu Val Ala Asp Cys Cys Asp His Ser Leu Leu Glu Ser				
180	185	190		
tgg tgagcttcgc ccacgtgaat tggctctcg cgacagtgaa aggcgatgga				628
Trp				

<210> 29

<211> 192

<212> PRT

<213> Cryptocodinium cohnii

<400> 29

Asp Asp Trp Ile Ala Ala Leu Ala Thr Ala Cys Ala Ser Thr Asp Gly				
1	5	10	15	
Val Thr Asp Val Asp Ser Leu Lys Pro Ser Ala Ser Ala Val Pro His				
20	25	30		
Gly Pro Pro Lys Ala Lys Val Ser Glu Leu Ser Ala Leu Arg Lys Val				
35	40	45		
His Asn Arg Asn Arg Thr Ser Val Leu Thr Asn Glu Asp Gly Gly Ile				
50	55	60		
Pro Glu Cys Asn Val Val Gly Ile Val Asn Leu Cys Val Thr Val Met				
65	70	75	80	
Val Leu Ile His Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Ser Ile Arg Lys His Gly				
85	90	95		
Val Leu Leu Asp Thr Phe Arg Val Ala Ala His Thr Ala Leu Lys Pro				
100	105	110		
Gly Asn Phe Gln Cys Thr Leu Cys Phe Phe Ala Leu Pro Val Leu Ala				
115	120	125		
Ile Leu Ala Thr Phe Ile Glu Val Leu Ala Ser Lys Gly Gln Leu Gly				
130	135	140		
Ile Ser Leu Arg Glu His Pro Ala Cys Arg Ala Leu Tyr Asn Leu Pro				
145	150	155	160	
Tyr His Pro Cys Pro Gly His Pro Pro Leu Ser Gly Asn Ser Ser Arg				
165	170	175		

35

Gly Ser Leu Val Ala Asp Cys Cys Asp His Ser Leu Leu Glu Ser Trp
 180 185 190

<210> 30

<211> 1272

<212> DNA

<213> Cryptocodinium cohnii

<220>

<221> CDS

<222> (164)..(1120)

<223> DAGAT

<400> 30

ggacactgac atggactgaa ggagtagaaaa gccgtagcca ttttggctca agctccagtg	60
aacagtgcgc ccctgactgc agaggggtgc ggcacaaaacc ctcagataca cacacatccc	120
gtgagtttat agattcttgtt ctcgcgtct tcttgcgaa gcg atg gct gga aag	175
Met Ala Gly Lys	
1	
tgg atg ctg ctc agt ggt gca gca gct gca gcg ttg gcg ctt ctg	223
Trp Met Leu Leu Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala Leu Ala Leu Leu	
5 10 15 20	
gag ggc acc cag ctt cga gcg tcg aca tcg gca cgc gcc cgg ata ttg	271
Glu Gly Thr Gln Leu Arg Ala Ser Thr Ser Ala Arg Ala Arg Ile Leu	
25 30 35	
ctg gtt tcg ttg gca gca tat ctc cca acg tac ctc gat gga agc gag	319
Leu Val Ser Ala Ala Tyr Leu Pro Thr Tyr Leu Asp Gly Ser Glu	
40 45 50	
tac cgg gct gcc cct cga cga agc gag cga gcc tca cgg gtc ctg cgg	367
Tyr Arg Ala Ala Pro Arg Arg Ser Glu Arg Ala Ser Arg Val Leu Arg	
55 60 65	
cag ttg tac aaa gtc atg gta aat tgg ttc ttc aca atc aaa cgg cca	415
Gln Leu Tyr Lys Val Met Val Asn Trp Phe Phe Thr Ile Lys Arg Pro	
70 75 80	
gta atc gag gct tcc gaa gag ctg aca gct tgt gac cag tgc atc ttg	463
Val Ile Glu Ala Ser Glu Glu Leu Thr Ala Cys Asp Gln Cys Ile Leu	
85 90 95 100	
gcg gtc cat ccc cat gga gta cct tct ctc gac cat ttg ctg acg gtc	511
Ala Val His Pro His Gly Val Pro Ser Leu Asp His Leu Leu Thr Val	
105 110 115	
atc gcc tat gat cct gac ttg gaa cgg gtc ttg ccc cag ttg cgg aga	559
Ile Ala Tyr Asp Pro Asp Leu Glu Arg Val Leu Pro Gln Leu Arg Arg	
120 125 130	
agt gcc ttg agt gca ggt gtc ctg ttc aag att ccc att ctg cgc gag	607
Ser Ala Leu Ser Ala Gly Val Leu Phe Lys Ile Pro Ile Leu Arg Glu	
135 140 145	
gtc ctt ctg tgg act ggc tgt gtc gac gct ggc ggg aag acc gtc gac	655
Val Leu Leu Trp Thr Gly Cys Val Asp Ala Gly Gly Lys Thr Val Asp	
150 155 160	
tct tgc ttg aag gct ggt ctc agc ctt tct gtt gtc ccc ggc ggc gaa	703
Ser Cys Leu Lys Ala Gly Leu Ser Leu Ser Val Val Pro Gly Gly Glu	
165 170 175 180	

cgc gag caa ctt ctc gca cag cga ggg aac aag gaa atc ctc gtg ctg	751
Arg Glu Gln Leu Leu Ala Gln Arg Gly Asn Lys Glu Ile Leu Val Leu	
185 190 195	
aaa cac agg aag ggc ttt gtc aag tac gcc ttg agg cat ggc att ccg	799
Lys His Arg Lys Gly Phe Val Lys Tyr Ala Leu Arg His Gly Ile Pro	
200 205 210	
ttg gta cct gtg tat tgc ttc ggc gag aac caa ctt ttt tgg cag tcc	847
Leu Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Glu Asn Gln Leu Phe Trp Gln Ser	
215 220 225	
tcc ttc ctc ttc aag gtt cgc agt tgg ctg cgg cgc act ctg gga gtg	895
Ser Phe Leu Phe Lys Val Arg Ser Trp Leu Arg Arg Thr Leu Gly Val	
230 235 240	
gcg ctc gtg ttg ccc tac gga ggc tgc tgc aat ctg cct ggt gtg ccc	943
Ala Leu Val Leu Pro Tyr Gly Gly Cys Cys Asn Leu Pro Gly Val Pro	
245 250 255 260	
ttc tcg gag ccg gtg cag ctc gtc gtc gga gct ccc ttg aag ctt ccg	991
Phe Ser Glu Pro Val Gln Leu Val Val Gly Ala Pro Leu Lys Leu Pro	
265 270 275	
aag atc gaa gag ccg agc gga gtg gaa ata gcc aag tgg cac gct ccg	1039
Lys Ile Glu Glu Pro Ser Gly Val Glu Ile Ala Lys Trp His Ala Arg	
280 285 290	
tac atg gag tgt ttg gaa gcc ttg ttc aag cgg cac cga gtt gaa gct	1087
Tyr Met Glu Cys Leu Glu Ala Leu Phe Lys Arg His Arg Val Glu Ala	
295 300 305	
gga tat cct gaa ttg gaa ctc gag ttc atc tga aggtttcaag tttacatgtg	1140
Gly Tyr Pro Glu Leu Glu Leu Glu Phe Ile	
310 315	
tctcacagtc ctccgctctg agccccactc attgttagtta ctcttctatg ttgtcaacgt	1200
cgaccacagg agttaccgtc aaagacggtt gctccttgct gcttcgagag aaaaaaaaaaa	1260
aaaaaaaaaa aa	1272

<210> 31

<211> 318

<212> PRT

<213> Cryptocodinium cohnii

<400> 31

Met Ala Gly Lys Trp Met Leu Leu Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala	
1 5 10 15	
Leu Ala Leu Leu Glu Gly Thr Gln Leu Arg Ala Ser Thr Ser Ala Arg	
20 25 30	
Ala Arg Ile Leu Leu Val Ser Leu Ala Ala Tyr Leu Pro Thr Tyr Leu	
35 40 45	
Asp Gly Ser Glu Tyr Arg Ala Ala Pro Arg Arg Ser Glu Arg Ala Ser	
50 55 60	
Arg Val Leu Arg Gln Leu Tyr Lys Val Met Val Asn Trp Phe Phe Thr	
65 70 75 80	
Ile Lys Arg Pro Val Ile Glu Ala Ser Glu Glu Leu Thr Ala Cys Asp	
85 90 95	
Gln Cys Ile Leu Ala Val His Pro His Gly Val Pro Ser Leu Asp His	
100 105 110	
Leu Leu Thr Val Ile Ala Tyr Asp Pro Asp Leu Glu Arg Val Leu Pro	

115	120	125
Gln Leu Arg Arg Ser Ala Leu Ser Ala Gly Val Leu Phe Lys Ile Pro		
130	135	140
Ile Leu Arg Glu Val Leu Leu Trp Thr Gly Cys Val Asp Ala Gly Gly		
145	150	155
Lys Thr Val Asp Ser Cys Leu Lys Ala Gly Leu Ser Leu Ser Val Val		
165	170	175
Pro Gly Gly Glu Arg Glu Gln Leu Leu Ala Gln Arg Gly Asn Lys Glu		
180	185	190
Ile Leu Val Leu Lys His Arg Lys Gly Phe Val Lys Tyr Ala Leu Arg		
195	200	205
His Gly Ile Pro Leu Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Glu Asn Gln Leu		
210	215	220
Phe Trp Gln Ser Ser Phe Leu Phe Lys Val Arg Ser Trp Leu Arg Arg		
225	230	235
Thr Leu Gly Val Ala Leu Val Leu Pro Tyr Gly Gly Cys Cys Asn Leu		
245	250	255
Pro Gly Val Pro Phe Ser Glu Pro Val Gln Leu Val Val Gly Ala Pro		
260	265	270
Leu Lys Leu Pro Lys Ile Glu Glu Pro Ser Gly Val Glu Ile Ala Lys		
275	280	285
Trp His Ala Arg Tyr Met Glu Cys Leu Glu Ala Leu Phe Lys Arg His		
290	295	300
Arg Val Glu Ala Gly Tyr Pro Glu Leu Glu Leu Glu Phe Ile		
305	310	315

<210> 32

<211> 448

<212> DNA

<213> Cryptocodinium cohnii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(426)

<223> DAGAT

<400> 32

atc aag atg gtg ccg ttt ttg aag aac gtg ctg ggg ctc ttt ggg ctg	48
Ile Lys Met Val Pro Phe Leu Lys Asn Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu	
1 5 10 15	
atc gac gcg agc aag cag gtg ttg gtc aag cga ttg aag cgc cca ggt	96
Ile Asp Ala Ser Lys Gln Val Leu Val Lys Arg Leu Lys Arg Pro Gly	
20 25 30	
ggt tcc ctg gtg att tac atc gga ggg atg gtg gag ctc ttc atg tcc	144
Gly Ser Leu Val Ile Tyr Ile Gly Gly Met Val Glu Leu Phe Met Ser	
35 40 45	
agc ccc aag cag gaa gtc gtc ttc ttg aag aag agg aag ggt ttt atc	192
Ser Pro Lys Gln Glu Val Val Phe Leu Lys Lys Arg Lys Gly Phe Ile	
50 55 60	
cga ctc gct ctg agc aca ggt gcc gat gtc gtg ccg atc tac ttg ttc	240
Arg Leu Ala Leu Ser Thr Gly Ala Asp Val Val Pro Ile Tyr Leu Phe	
65 70 75 80	
ggc aac acc acc gtc ctc tca gtc acc gct ggc cct ctg gcc tct	288

38

Gly Asn Thr Thr Val Leu Ser Val Leu Thr Ala Gly Pro Leu Ala Ser
 85 90 95
 ctg agc cgt gcc gcc ggg gtg tca gtg acc att ttt tgg gga cgc ttc
 Leu Ser Arg Ala Ala Gly Val Ser Val Thr Ile Phe Trp Gly Arg Phe 336
 100 105 110
 ggc ttg ccg atg ccc tac ccc gtc aag ctc acc tat gcc cgt ggc cgt
 Gly Leu Pro Met Pro Tyr Pro Val Lys Leu Thr Tyr Ala Arg Gly Arg 384
 115 120 125
 ccc atc ggt ctc cct cat atc gaa atc cta cag atg aga cat
 Pro Ile Gly Leu Pro His Ile Glu Ile Leu Gln Met Arg His 426
 130 135 140
 tgaccgttgg catgacgtgt ac 448

<210> 33

<211> 142

<212> PRT

<213> *Cryptocodinium cohnii*

<400> 33

Ile Lys Met Val Pro Phe Leu Lys Asn Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu
 1 5 10 15
 Ile Asp Ala Ser Lys Gln Val Leu Val Lys Arg Leu Lys Arg Pro Gly
 20 25 30
 Gly Ser Leu Val Ile Tyr Ile Gly Gly Met Val Glu Leu Phe Met Ser
 35 40 45
 Ser Pro Lys Gln Glu Val Val Phe Leu Lys Lys Arg Lys Gly Phe Ile
 50 55 60
 Arg Leu Ala Leu Ser Thr Gly Ala Asp Val Val Pro Ile Tyr Leu Phe
 65 70 75 80
 Gly Asn Thr Thr Val Leu Ser Val Leu Thr Ala Gly Pro Leu Ala Ser
 85 90 95
 Leu Ser Arg Ala Ala Gly Val Ser Val Thr Ile Phe Trp Gly Arg Phe
 100 105 110
 Gly Leu Pro Met Pro Tyr Pro Val Lys Leu Thr Tyr Ala Arg Gly Arg
 115 120 125
 Pro Ile Gly Leu Pro His Ile Glu Ile Leu Gln Met Arg His
 130 135 140

<210> 34

<211> 1757

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (76)...(1578)

<223> LCAT

<400> 34

ggcgccgcccag aggacgagac aagggggact tgtgagaatc ttcgagcttc aacctgtcaa

60

gcttcggtct ccacc atg tgt tca att tct tgt gga tcc act ccg cag caa 111
 Met Cys Ser Ile Ser Cys Gly Ser Thr Pro Gln Gln
 1 5 10
 ctc tgt cat tac agg aag agc ggg gag ctg att aca aga aag agt cgc 159
 Leu Cys His Tyr Arg Lys Ser Gly Glu Leu Ile Thr Arg Lys Ser Arg
 15 20 25
 gca gct att cgg tgg tgg agg tat ggc caa caa tgc aag gtg ctg ttg 207
 Ala Ala Ile Arg Trp Trp Arg Tyr Gly Gln Gln Cys Lys Val Leu Leu
 30 35 40
 ccg ttg gat ttg att cga tca tcg tct caa ttc ttc atc gta gtt ctc 255
 Pro Leu Asp Leu Ile Arg Ser Ser Gln Phe Phe Ile Val Val Leu
 45 50 55 60
 act ctg acg ctc ttc ctg ttc acc acg tgt gga gct gtg cat act gcg 303
 Thr Leu Thr Leu Phe Leu Phe Thr Thr Cys Gly Ala Val His Thr Ala
 65 70 75
 gca caa gac aga tca ttc gca aca ttg agc caa aga tca aga gcg tct 351
 Ala Gln Asp Arg Ser Phe Ala Thr Leu Ser Gln Arg Ser Arg Ala Ser
 80 85 90
 ctc ttc agt gtg gga cgg gca caa gca agg aac aaa cac cat ttg gcg 399
 Leu Phe Ser Val Gly Arg Ala Gln Ala Arg Asn Lys His His Leu Ala
 95 100 105
 ccg gtg gtc ata gtt cca ggc acc ggc ggg aat caa cta gag gcc agg 447
 Pro Val Val Ile Val Pro Gly Thr Gly Gly Asn Gln Leu Glu Ala Arg
 110 115 120
 ttg aca gct gat tac gag gct aac aag cca tgg tgc tac agc ttc aga 495
 Leu Thr Ala Asp Tyr Glu Ala Asn Lys Pro Trp Cys Tyr Ser Phe Arg
 125 130 135 140
 aaa gat tac ttc agg ttg tgg ctg gat gtg aaa aca ctg ttt cca cct 543
 Lys Asp Tyr Phe Arg Leu Trp Leu Asp Val Lys Thr Leu Phe Pro Pro
 145 150 155
 ttc acg acg tgt ttc gcc gac cgc ctg agc ttg gac tac aac ccg cag 591
 Phe Thr Thr Cys Phe Ala Asp Arg Leu Ser Leu Asp Tyr Asn Pro Gln
 160 165 170
 tcc gat gcc tat agc aac atc aag ggc gtg aag acg cgg gta ccg ttt 639
 Ser Asp Ala Tyr Ser Asn Ile Lys Gly Val Lys Thr Arg Val Pro Phe
 175 180 185
 ttt ggt act acc gaa gga atg gag tac ctg gat ccc tca ctc aaa ttc 687
 Phe Gly Thr Thr Glu Gly Met Glu Tyr Leu Asp Pro Ser Leu Lys Phe
 190 195 200
 ttg aca ggc tac atg ata cac ttg gtg aac gca tta aaa gct cat ggt 735
 Leu Thr Gly Tyr Met Ile His Leu Val Asn Ala Leu Lys Ala His Gly
 205 210 215 220
 tac gag aac gga aag tca tta tac gga gct cca tac gac ttt cgg ttc 783
 Tyr Glu Asn Gly Lys Ser Leu Tyr Gly Ala Pro Tyr Asp Phe Arg Phe
 225 230 235
 gca ccg ggg cca cat gca tcc aac gta gct cta gag tac ctg aaa gac 831
 Ala Pro Gly Pro His Ala Ser Asn Val Ala Leu Glu Tyr Leu Lys Asp
 240 245 250
 ctg aaa gat ctc ata gaa acc gcg tac tca gta aat gcc aac gag ccg 879
 Leu Lys Asp Leu Ile Glu Thr Ala Tyr Ser Val Asn Ala Asn Glu Pro
 255 260 265
 gtg gtc atc ctc gct cac agc atg ggc ggg ttg tgg act ctc ttc ttc 927
 Val Val Ile Leu Ala His Ser Met Gly Gly Leu Trp Thr Leu Phe Phe
 270 275 280

40

ctg aac cag caa tcc atg gag tgg agg aac aaa tac gtt tcc cgc ttt	975
Leu Asn Gln Gln Ser Met Glu Trp Arg Asn Lys Tyr Val Ser Arg Phe	
285 290 295 300	
gtg tct gta gct acc ccg tgg gga ggg gcg gtc gaa cag atg atg acc	1023
Val Ser Val Ala Thr Pro Trp Gly Gly Ala Val Glu Gln Met Met Thr	
305 310 315	
ttc gca tcc ggc aat ccg gag gga gtt ccc ttt gtg aac tcc ctg gtc	1071
Phe Ala Ser Gly Asn Pro Glu Gly Val Pro Phe Val Asn Ser Leu Val	
320 325 330	
gtg cgc gaa gag cag ccg cgc tca gag tct aac ttg tgg ctg ctg cca	1119
Val Arg Glu Glu Gln Arg Arg Ser Glu Ser Asn Leu Trp Leu Leu Pro	
335 340 345	
gtg cgg cgc tgc ttc aga gac cga cca ttg gta att acc tcg tcg cgc	1167
Val Arg Arg Cys Phe Arg Asp Arg Pro Leu Val Ile Thr Ser Ser Arg	
350 355 360	
aac tac aca gct ggg gac atg gaa cag ttt ctg tgc gac atc ggt ttc	1215
Asn Tyr Thr Ala Gly Asp Met Glu Gln Phe Leu Cys Asp Ile Gly Phe	
365 370 375 380	
cct gaa ggg gtc gcg cca tac aaa tcc ccg ata ccg cac cta acg gac	1263
Pro Glu Gly Val Ala Pro Tyr Lys Ser Arg Ile Pro His Leu Thr Asp	
385 390 395	
att cta caa cct cct caa gtc ccc gtc acc cta att cac ggc tat ggc	1311
Ile Leu Gln Pro Pro Gln Val Pro Val Thr Leu Ile His Gly Tyr Gly	
400 405 410	
gtg ccg acg gcg gag aca cta agc tac gag aag aag gga ttc gac aac	1359
Val Pro Thr Ala Glu Thr Leu Ser Tyr Glu Lys Lys Gly Phe Asp Asn	
415 420 425	
cat ccc gaa atc aca gaa ggt gat ggc gac ggg acg gtg aat gtg tgc	1407
His Pro Glu Ile Thr Glu Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Val Cys	
430 435 440	
agc ttg acc gcg gtg gtt gag gaa tgg gag cga gtc gca ggt cag gag	1455
Ser Leu Thr Ala Val Val Glu Glu Trp Glu Arg Val Ala Gly Gln Glu	
445 450 455 460	
ttg gaa atg att gcg ctg cat ggc aaa caa cat atg caa atc ttg cac	1503
Leu Glu Met Ile Ala Leu His Gly Lys Gln His Met Gln Ile Leu His	
465 470 475	
gac gac cat tct gtg caa gtg atc gtg gac gcc att ctc aat gtt acc	1551
Asp Asp His Ser Val Gln Val Ile Val Asp Ala Ile Leu Asn Val Thr	
480 485 490	
cca cag gaa cag ctt atg ttc cac taa gccctaatacg taaccctaaa	1598
Pro Gln Glu Gln Leu Met Phe His	
495 500	
cctagctcca atcctcacag gatcaggcca cattctccctt gaaaaacagc ataaggcga	1658
ttctccgcag cctctttcc attccacctc cccctttgtt tctctctcca ttcaattgtt	1718
caattgtttt tttattcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1757
<210> 35	
<211> 500	
<212> PRT	
<213> <i>Physcomitrella patens</i>	
<400> 35	

Met Cys Ser Ile Ser Cys Gly Ser Thr Pro Gln Gln Leu Cys His Tyr
 1 5 10 15
 Arg Lys Ser Gly Glu Leu Ile Thr Arg Lys Ser Arg Ala Ala Ile Arg
 20 25 30
 Trp Trp Arg Tyr Gly Gln Gln Cys Lys Val Leu Leu Pro Leu Asp Leu
 35 40 45
 Ile Arg Ser Ser Ser Gln Phe Phe Ile Val Val Leu Thr Leu Thr Leu
 50 55 60
 Phe Leu Phe Thr Thr Cys Gly Ala Val His Thr Ala Ala Gln Asp Arg
 65 70 75 80
 Ser Phe Ala Thr Leu Ser Gln Arg Ser Arg Ala Ser Leu Phe Ser Val
 85 90 95
 Gly Arg Ala Gln Ala Arg Asn Lys His His Leu Ala Pro Val Val Ile
 100 105 110
 Val Pro Gly Thr Gly Gly Asn Gln Leu Glu Ala Arg Leu Thr Ala Asp
 115 120 125
 Tyr Glu Ala Asn Lys Pro Trp Cys Tyr Ser Phe Arg Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140
 Arg Leu Trp Leu Asp Val Lys Thr Leu Phe Pro Pro Phe Thr Thr Cys
 145 150 155 160
 Phe Ala Asp Arg Leu Ser Leu Asp Tyr Asn Pro Gln Ser Asp Ala Tyr
 165 170 175
 Ser Asn Ile Lys Gly Val Lys Thr Arg Val Pro Phe Phe Gly Thr Thr
 180 185 190
 Glu Gly Met Glu Tyr Leu Asp Pro Ser Leu Lys Phe Leu Thr Gly Tyr
 195 200 205
 Met Ile His Leu Val Asn Ala Leu Lys Ala His Gly Tyr Glu Asn Gly
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Gly Ala Pro Tyr Asp Phe Arg Phe Ala Pro Gly Pro
 225 230 235 240
 His Ala Ser Asn Val Ala Leu Glu Tyr Leu Lys Asp Leu Lys Asp Leu
 245 250 255
 Ile Glu Thr Ala Tyr Ser Val Asn Ala Asn Glu Pro Val Val Ile Leu
 260 265 270
 Ala His Ser Met Gly Gly Leu Trp Thr Leu Phe Phe Leu Asn Gln Gln
 275 280 285
 Ser Met Glu Trp Arg Asn Lys Tyr Val Ser Arg Phe Val Ser Val Ala
 290 295 300
 Thr Pro Trp Gly Gly Ala Val Glu Gln Met Met Thr Phe Ala Ser Gly
 305 310 315 320
 Asn Pro Glu Gly Val Pro Phe Val Asn Ser Leu Val Val Arg Glu Glu
 325 330 335
 Gln Arg Arg Ser Glu Ser Asn Leu Trp Leu Leu Pro Val Arg Arg Cys
 340 345 350
 Phe Arg Asp Arg Pro Leu Val Ile Thr Ser Ser Arg Asn Tyr Thr Ala
 355 360 365
 Gly Asp Met Glu Gln Phe Leu Cys Asp Ile Gly Phe Pro Glu Gly Val
 370 375 380
 Ala Pro Tyr Lys Ser Arg Ile Pro His Leu Thr Asp Ile Leu Gln Pro
 385 390 395 400
 Pro Gln Val Pro Val Thr Leu Ile His Gly Tyr Gly Val Pro Thr Ala
 405 410 415
 Glu Thr Leu Ser Tyr Glu Lys Lys Gly Phe Asp Asn His Pro Glu Ile
 420 425 430

42

Thr Glu Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Val Cys Ser Leu Thr Ala
 435 440 445
 Val Val Glu Glu Trp Glu Arg Val Ala Gly Gln Glu Leu Glu Met Ile
 450 455 460
 Ala Leu His Gly Lys Gln His Met Gln Ile Leu His Asp Asp His Ser
 465 470 475 480
 Val Gln Val Ile Val Asp Ala Ile Leu Asn Val Thr Pro Gln Glu Gln
 485 490 495
 Leu Met Phe His
 500

<210> 36

<211> 1893

<212> DNA

<213> Fusarium gramineum

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1893)

<223> LCAT

<400> 36

atg gga aag tcc act tta cga cgc cgg aat ggc caa gat gcg aca aat	48
Met Gly Lys Ser Thr Leu Arg Arg Arg Asn Gly Gln Asp Ala Thr Asn	
1 5 10 15	
aac gat agc gcc gac gct gac gac act ccg aga gaa gaa agc cca acg	96
Asn Asp Ser Ala Asp Ala Asp Asp Thr Pro Arg Glu Glu Ser Pro Thr	
20 25 30	
gct gag ccg acc aca cac gtt cga gtt gtt caa cac gcc gtg ccc aga	144
Ala Glu Pro Thr Thr His Val Arg Val Val Gln His Ala Val Pro Arg	
35 40 45	
acc cga aaa cgc cgc aac acc ttc gtc ttc ttc ctt ggt agt ttg ttt	192
Thr Arg Lys Arg Arg Asn Thr Phe Val Phe Phe Leu Gly Ser Leu Phe	
50 55 60	
gga att ata gcc gca gga ttt ttc gct tcc agc aat gat ctt att gac	240
Gly Ile Ile Ala Ala Gly Phe Phe Ala Ser Ser Asn Asp Leu Ile Asp	
65 70 75 80	
ctc ccc gag ttt acc gac ttg tcg atg gat aac ttg atg gat gtt ctg	288
Leu Pro Glu Phe Thr Asp Leu Ser Met Asp Asn Leu Met Asp Val Leu	
85 90 95	
cct gcc ggc ttg ata aag gac atg cgc gac ctt gtt cag ggc gag cgg	336
Pro Ala Gly Leu Ile Lys Asp Met Arg Asp Leu Val Gln Gly Glu Arg	
100 105 110	
gac att gcc gaa tcg tac gag cca ttc tct gtt ggc gaa aag gct cga	384
Asp Ile Ala Glu Ser Tyr Glu Pro Phe Ser Val Gly Glu Lys Ala Arg	
115 120 125	
tcc gag ggt cta gga gtt cac cat cct atg atc atg ata cct ggt gtt	432
Ser Glu Gly Leu Gly Val His His Pro Met Ile Met Ile Pro Gly Val	
130 135 140	
atc tca act gga ctc gaa tcg tgg ggt acg gct aat atc tcg aaa ccc	480
Ile Ser Thr Gly Leu Glu Ser Trp Gly Thr Ala Asn Ile Ser Lys Pro	
145 150 155 160	

tac ttt aga aaa cga ctt tgg ggt agt tgg aca atg atg aga gct ctg 528
 Tyr Phe Arg Lys Arg Leu Trp Gly Ser Trp Thr Met Met Arg Ala Leu
 165 170 175
 gtt atg gac aag gag gtt tgg aag aag cac gtc atg ctc gac aag agg 576
 Val Met Asp Lys Glu Val Trp Lys Lys His Val Met Leu Asp Lys Arg
 180 185 190
 acg ggc ctt gac ccg cct gac gta aag ttg agg gct gcc caa ggg ttc 624
 Thr Gly Leu Asp Pro Pro Asp Val Lys Leu Arg Ala Ala Gln Gly Phe
 195 200 205
 gat gcg acc gat ttc ttc atc acg gga tat tgg atc tgg agc aaa atc 672
 Asp Ala Thr Asp Phe Phe Ile Thr Gly Tyr Trp Ile Trp Ser Lys Ile
 210 215 220
 ttt gag aat ctc gca tcc atc ggc tac gac cca acg aac tcg ttc acg 720
 Phe Glu Asn Leu Ala Ser Ile Gly Tyr Asp Pro Thr Asn Ser Phe Thr
 225 230 235 240
 gct gct tac gat tgg cgc ttg tcg tat ccc aac ctt gag gta cgg gac 768
 Ala Ala Tyr Asp Trp Arg Leu Ser Tyr Pro Asn Leu Glu Val Arg Asp
 245 250 255
 cgc tac ttc act cgg cta aag tcg cat atc gaa atc gcg gtg gcc act 816
 Arg Tyr Phe Thr Arg Leu Lys Ser His Ile Glu Ile Ala Val Ala Thr
 260 265 270
 gag gac aaa aaa gtc gtc ctc gca tca cac agt atg ggg agc caa gtc 864
 Glu Asp Lys Lys Val Val Leu Ala Ser His Ser Met Gly Ser Gln Val
 275 280 285
 ctt tac tat ttt ctc cac tgg gtg cag tca gaa aga ggc gga cgc ggt 912
 Leu Tyr Tyr Phe Leu His Trp Val Gln Ser Glu Arg Gly Arg Gly
 290 295 300
 ggg ccg gat tgg gtt gag cgt cac att gac gcc tgg atc aac atc agc 960
 Gly Pro Asp Trp Val Glu Arg His Ile Asp Ala Trp Ile Asn Ile Ser
 305 310 315 320
 gga tgc atg ctt gga gca gtc aag gat ttg acc gct gtg ctc tcc ggc 1008
 Gly Cys Met Leu Gly Ala Val Lys Asp Leu Thr Ala Val Leu Ser Gly
 325 330 335
 gag atg cgc gac aca gct caa ctg aac ccg ttc gct att tac ggc ctg 1056
 Glu Met Arg Asp Thr Ala Gln Leu Asn Pro Phe Ala Ile Tyr Gly Leu
 340 345 350
 gaa aag ttc ttg agt aaa gag gag aga gcc gag atc ttt cgc ggc atg 1104
 Glu Lys Phe Leu Ser Lys Glu Glu Arg Ala Glu Ile Phe Arg Gly Met
 355 360 365
 ccc ggg ata tcc tcc atg ttg ccc atc ggc ggc aac tct gta tgg ggt 1152
 Pro Gly Ile Ser Ser Met Leu Pro Ile Gly Gly Asn Ser Val Trp Gly
 370 375 380
 aac ttg acc tgg gct cca gac gac ttg cca ggc cag aac cgt tca tat 1200
 Asn Leu Thr Trp Ala Pro Asp Asp Leu Pro Gly Gln Asn Arg Ser Tyr
 385 390 395 400
 gga tct ctc ttg aac ttt agg gtc ggt tcg aac tgg aca act cct gat 1248
 Gly Ser Leu Leu Asn Phe Arg Val Gly Ser Asn Trp Thr Thr Pro Asp
 405 410 415
 cgt aac ttt acc gtc gag gaa ggt gtg tcc tat ttg ctt aac aca acg 1296
 Arg Asn Phe Thr Val Glu Glu Gly Val Ser Tyr Leu Leu Asn Thr Thr
 420 425 430
 gag gac tgg tat caa gac cag atc aag ggc agt tat tct cgg ggc att 1344
 Glu Asp Trp Tyr Gln Asp Gln Ile Lys Gly Ser Tyr Ser Arg Gly Ile
 435 440 445

gct cat tcc ata gat gag gtc gaa gcc aat gag aat gac ccc aag aag	1392
Ala His Ser Ile Asp Glu Val Glu Ala Asn Glu Asn Asp Pro Lys Lys	
450 455 460	
tgg atc aat cct ctc gag acg cga ttg cca ctt gct cct agc ctc aag	1440
Trp Ile Asn Pro Leu Glu Thr Arg Leu Pro Leu Ala Pro Ser Leu Lys	
465 470 475 480	
atc tac tgc ttt tat ggt gtt gga aaa ccg acc gag cga ggg tac ttc	1488
Ile Tyr Cys Phe Tyr Gly Val Gly Lys Pro Thr Glu Arg Gly Tyr Phe	
485 490 495	
tat aag cca ccg gat cag cca tca ttg acc aac ctc aac atc aca ata	1536
Tyr Lys Pro Pro Asp Gln Pro Ser Leu Thr Asn Leu Asn Ile Thr Ile	
500 505 510	
gat acg ggc tat acc gaa gga gac gtg gat cat ggc gtt gtc atg ggc	1584
Asp Thr Gly Tyr Thr Glu Gly Asp Val Asp His Gly Val Val Met Gly	
515 520 525	
gag gga gat ggt acc gtg aac ctc ctc agt aca ggc tac atg tgt aat	1632
Glu Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Leu Ser Thr Gly Tyr Met Cys Asn	
530 535 540	
cat ggc tgg aat atg aaa cgc tac aac cca gca ggc gtc aag gtt aca	1680
His Gly Trp Asn Met Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Gly Val Lys Val Thr	
545 550 555 560	
gtt gtc gag atg cct cac gag ccg gac cgc ttc aat cct cga gga ggg	1728
Val Val Glu Met Pro His Glu Pro Asp Arg Phe Asn Pro Arg Gly Gly	
565 570 575	
cct cgc acg gcc gac cac gtt gac atc ttg ggg cga tac aac ctg aac	1776
Pro Arg Thr Ala Asp His Val Asp Ile Leu Gly Arg Tyr Asn Leu Asn	
580 585 590	
gag ttg ctg tta cga gta gcg agc ggc aaa ggt gac acg att acg aac	1824
Glu Leu Leu Arg Val Ala Ser Gly Lys Gly Asp Thr Ile Thr Asn	
595 600 605	
tat gtt gtg agc aac atc aaa gaa tat gca tcc agg gtt aag att tac	1872
Tyr Val Val Ser Asn Ile Lys Glu Tyr Ala Ser Arg Val Lys Ile Tyr	
610 615 620	
gat gat gag gag act tca tag	
Asp Asp Glu Glu Thr Ser	
625 630	1893

<210> 37

<211> 630

<212> PRT

<213> Fusarium gramineum

<400> 37

Met Gly Lys Ser Thr Leu Arg Arg Asn Gly Gln Asp Ala Thr Asn	
1 5 10 15	
Asn Asp Ser Ala Asp Ala Asp Asp Thr Pro Arg Glu Glu Ser Pro Thr	
20 25 30	
Ala Glu Pro Thr Thr His Val Arg Val Val Gln His Ala Val Pro Arg	
35 40 45	
Thr Arg Lys Arg Arg Asn Thr Phe Val Phe Phe Leu Gly Ser Leu Phe	
50 55 60	
Gly Ile Ile Ala Ala Gly Phe Phe Ala Ser Ser Asn Asp Leu Ile Asp	

65	70	75	80
Leu Pro Glu Phe Thr Asp Leu Ser Met Asp Asn Leu Met Asp Val Leu			
85	90	95	
Pro Ala Gly Leu Ile Lys Asp Met Arg Asp Leu Val Gln Gly Glu Arg			
100	105	110	
Asp Ile Ala Glu Ser Tyr Glu Pro Phe Ser Val Gly Glu Lys Ala Arg			
115	120	125	
Ser Glu Gly Leu Gly Val His His Pro Met Ile Met Ile Pro Gly Val			
130	135	140	
Ile Ser Thr Gly Leu Glu Ser Trp Gly Thr Ala Asn Ile Ser Lys Pro			
145	150	155	160
Tyr Phe Arg Lys Arg Leu Trp Gly Ser Trp Thr Met Met Arg Ala Leu			
165	170	175	
Val Met Asp Lys Glu Val Trp Lys Lys His Val Met Leu Asp Lys Arg			
180	185	190	
Thr Gly Leu Asp Pro Pro Asp Val Lys Leu Arg Ala Ala Gln Gly Phe			
195	200	205	
Asp Ala Thr Asp Phe Phe Ile Thr Gly Tyr Trp Ile Trp Ser Lys Ile			
210	215	220	
Phe Glu Asn Leu Ala Ser Ile Gly Tyr Asp Pro Thr Asn Ser Phe Thr			
225	230	235	240
Ala Ala Tyr Asp Trp Arg Leu Ser Tyr Pro Asn Leu Glu Val Arg Asp			
245	250	255	
Arg Tyr Phe Thr Arg Leu Lys Ser His Ile Glu Ile Ala Val Ala Thr			
260	265	270	
Glu Asp Lys Lys Val Val Leu Ala Ser His Ser Met Gly Ser Gln Val			
275	280	285	
Leu Tyr Tyr Phe Leu His Trp Val Gln Ser Glu Arg Gly Gly Arg Gly			
290	295	300	
Gly Pro Asp Trp Val Glu Arg His Ile Asp Ala Trp Ile Asn Ile Ser			
305	310	315	320
Gly Cys Met Leu Gly Ala Val Lys Asp Leu Thr Ala Val Leu Ser Gly			
325	330	335	
Glu Met Arg Asp Thr Ala Gln Leu Asn Pro Phe Ala Ile Tyr Gly Leu			
340	345	350	
Glu Lys Phe Leu Ser Lys Glu Glu Arg Ala Glu Ile Phe Arg Gly Met			
355	360	365	
Pro Gly Ile Ser Ser Met Leu Pro Ile Gly Gly Asn Ser Val Trp Gly			
370	375	380	
Asn Leu Thr Trp Ala Pro Asp Asp Leu Pro Gly Gln Asn Arg Ser Tyr			
385	390	395	400
Gly Ser Leu Leu Asn Phe Arg Val Gly Ser Asn Trp Thr Thr Pro Asp			
405	410	415	
Arg Asn Phe Thr Val Glu Glu Gly Val Ser Tyr Leu Leu Asn Thr Thr			
420	425	430	
Glu Asp Trp Tyr Gln Asp Gln Ile Lys Gly Ser Tyr Ser Arg Gly Ile			
435	440	445	
Ala His Ser Ile Asp Glu Val Glu Ala Asn Glu Asn Asp Pro Lys Lys			
450	455	460	
Trp Ile Asn Pro Leu Glu Thr Arg Leu Pro Leu Ala Pro Ser Leu Lys			
465	470	475	480
Ile Tyr Cys Phe Tyr Gly Val Gly Lys Pro Thr Glu Arg Gly Tyr Phe			
485	490	495	
Tyr Lys Pro Pro Asp Gln Pro Ser Leu Thr Asn Leu Asn Ile Thr Ile			

46

500	505	510	
Asp Thr Gly Tyr Thr Glu Gly Asp Val Asp His Gly Val Val Met Gly			
515	520	525	
Glu Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Leu Ser Thr Gly Tyr Met Cys Asn			
530	535	540	
His Gly Trp Asn Met Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Gly Val Lys Val Thr			
545	550	555	560
Val Val Glu Met Pro His Glu Pro Asp Arg Phe Asn Pro Arg Gly Gly			
565	570	575	
Pro Arg Thr Ala Asp His Val Asp Ile Leu Gly Arg Tyr Asn Leu Asn			
580	585	590	
Glu Leu Leu Leu Arg Val Ala Ser Gly Lys Gly Asp Thr Ile Thr Asn			
595	600	605	
Tyr Val Val Ser Asn Ile Lys Glu Tyr Ala Ser Arg Val Lys Ile Tyr			
610	615	620	
Asp Asp Glu Glu Thr Ser			
625	630		

<210> 38

<211> 849

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(849)

<223> Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase

<400> 38

atg gag aac ttc tgg tcg atc gtc gtg ttt ttt cta ctc tca att ctc	48
Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu	
1 5 10 15	
ttc att tta tat aac ata tcg aca gta tgc cac tac tat atg cgg att	96
Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Met Arg Ile	
20 25 30	
tcg ttt tat tac ttc aca att tta ttg cat gga atg gaa gtt tgt gtt	144
Ser Phe Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val	
35 40 45	
aca atg atc cct tct tgg cta aat ggg aag ggt gct gat tac gtg ttt	192
Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe	
50 55 60	
cac tcg ttt ttc tat tgg tgt aaa tgg act ggt gtt cat aca aca gtc	240
His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val	
65 70 75 80	
tat gga tat gaa aaa aca caa gtt gaa ggt ccg gct gta gtt att tgt	288
Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys	
85 90 95	
aat cat cag agt tct ctc gac att cta tcg atg gca tca atc tgg ccg	336
Asn His Gln Ser Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro	
100 105 110	
aag aat tgt gtt gta atg atg aaa cga att ctt gcc tat gtt cca ttc	384
Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe	

115	120	125	
ttc aat ctc gga gcc tac ttt tcc aac aca atc ttc atc gat cga tat			432
Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr			
130	135	140	
aac cgt gaa cgt gcg atg gct tca gtt gat tat tgt gca tct gaa atg			480
Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met			
145	150	155	160
aag aac aga aat ctt aaa ctt tgg gta ttt ccg gaa gga aca aga aat			528
Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Asn			
165	170	175	
cgt gaa gga ggg ttc att cca ttc aag aaa gga gca ttc aat att gca			576
Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala			
180	185	190	
gtt cgt gcg cag att ccc att att cca gtt gta ttc tca gac tat cgg			624
Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg			
195	200	205	
gat ttc tac tca aag cca ggc cga tat ttc aag aat gat gga gaa gtt			672
Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val			
210	215	220	
gtt att cga gtt ctg gat ggc att cca aca aaa ggg ctc act ctt gat			720
Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp			
225	230	235	240
gac gtc agc gag ttg tct gat atg tgt cgg gac gtt atg ttg gca gcc			768
Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala			
245	250	255	
tat aag gaa gtt act cta gaa gct cag caa cga aat gcg aca cgg cgt			816
Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg			
260	265	270	
gga gaa aca aaa gac ggg aag aaa tct gag taa			849
Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Ser Glu			
275	280		

<210> 39

<211> 282

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 39

Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu			
1	5	10	15
Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Met Arg Ile			
20	25	30	
Ser Phe Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val			
35	40	45	
Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe			
50	55	60	
His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val			
65	70	75	80
Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys			
85	90	95	
Asn His Gln Ser Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro			
100	105	110	

48

Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe
 115 120 125
 Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr
 130 135 140
 Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met
 145 150 155 160
 Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Asn
 165 170 175
 Arg Glu Gly Phe Ile Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala
 180 185 190
 Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg
 195 200 205
 Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val
 210 215 220
 Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp
 225 230 235 240
 Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala
 245 250 255
 Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg
 260 265 270
 Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser Glu
 275 280
 <210> 40

<211> 849

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(849)

<223> Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase

<400> 40

atg gag aac ttc tgg tcg atc gtc gtg ttt ttt cta ctc tca att ctc	48
Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu	
1 5 10 15	
ttc att tta tat aac ata tcg aca gta tgc cac tac tat atg cgg att	96
Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Met Arg Ile	
20 25 30	
tcg ttt tat tac ttc aca att tta ttg cat gga atg gaa gtt tgt gtt	144
Ser Phe Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val	
35 40 45	
aca atg atc cct tct tgg cta aat ggg aag ggt gct gat tac gtg ttt	192
Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe	
50 55 60	
cac tcg ttt ttc tat tgg tgt aaa tgg act ggt gtt cat aca aca gtc	240
His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val	
65 70 75 80	
tat gga tat gaa aaa aca caa gtt gaa ggt ccg gct gta gtt att tgt	288
Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys	
85 90 95	
aat cat cag agt tct ctc gac att cta tcg atg gca tca atc tgg ccg	336

49

Asn His Gln Ser Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro			
100	105	110	
aag aat tgt gtt gta atg atg aaa cga att ctt gcc tat gtt cca ttc			384
Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe			
115	120	125	
ttc aat ctc gga gcc tac ttt tcc aac aca atc ttc atc gat cga tat			432
Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr			
130	135	140	
aac cgt gaa cgt gcg atg gct tca gtt gat tat tgt gca tct gaa atg			480
Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met			
145	150	155	160
aag aac aga aat ctt aaa ctt tgg gta tct ccg gaa gga aca aga aat			528
Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Ser Pro Glu Gly Thr Arg Asn			
165	170	175	
cgt gaa gga ggg ttc att cca ttc aag aaa gga gca ttc aat att gca			576
Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala			
180	185	190	
gtt cgt gcg cag att ccc att att cca gtt gta ttc tca gac tat cgg			624
Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg			
195	200	205	
gat ttc tac tca aag cca ggc cga tat ttc aag aat gat gga gaa gtt			672
Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val			
210	215	220	
gtt att cga gtt ctg gat gcg att cca aca aaa ggg ctc act ctt gat			720
Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp			
225	230	235	240
gac gtc agc gag ttg tct gat atg tgt cgg gac gtt atg ttg gca gcc			768
Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala			
245	250	255	
tat aag gaa gtt act cta gaa gct cag caa cga aat gcg aca cgg cgt			816
Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg			
260	265	270	
gga gaa aca aaa gac ggg aag aaa tct gag taa			849
Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser Glu			
275	280		

<210> 41

<211> 282

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 41

Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu			
1	5	10	15
Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Met Arg Ile			
20	25	30	
Ser Phe Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val			
35	40	45	
Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe			
50	55	60	
His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val			
65	70	75	80

50

Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys
 85 90 95
 Asn His Gln Ser Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro
 100 105 110
 Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe
 115 120 125
 Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr
 130 135 140
 Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met
 145 150 155 160
 Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Ser Pro Glu Gly Thr Arg Asn
 165 170 175
 Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala
 180 185 190
 Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg
 195 200 205
 Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val
 210 215 220
 Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp
 225 230 235 240
 Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala
 245 250 255
 Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg
 260 265 270
 Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser Glu
 275 280

<210> 42

<211> 849

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(849)

<223> Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase

<400> 42

atg gag aac ttc tgg tcg atc gtc gtg ttt ttt cta ctc tca att ctc	48
Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu	
1 5 10 15	
ttc att tta tat aac ata tcg aca gta tgc cac tac tat gtg cgg att	96
Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Val Arg Ile	
20 25 30	
tcg ttt tat tac ttc aca att tta ttg cat gga atg gaa gtt tgt gtt	144
Ser Phe Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val	
35 40 45	
aca atg atc cct tct tgg cta aat ggg aag ggt gct gat tac gtg ttt	192
Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe	
50 55 60	
cac tcg ttt ttc tat tgg tgt aaa tgg act ggt gtt cat aca aca gtc	240
His Ser Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val	

51

65	70	75	80	
tat gga tat gaa aaa aca caa gtt gaa ggt ccg gct gta gtt att tgt				288
Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys				
85	90	95		
aat cat cag agt tct ctc gac att cta tcg atg gca tca atc tgg ccg				336
Asn His Gln Ser Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro				
100	105	110		
aag aat tgt gtt gta atg atg aaa cga att ctt gcc tat gtt cca ttc				384
Lys Asn Cys Val Val Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe				
115	120	125		
ttc aat ctc gga gcc tac ttt tcc aac aca atc ttc atc gat cga tat				432
Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr				
130	135	140		
aac cgt gaa cgt gcg atg gct tca gtt gat tat tgt gca tct gaa atg				480
Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met				
145	150	155	160	
aag aac aga aat ctt aaa ctt tgg gta ttt ccg gaa gga aca aga aat				528
Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Asn				
165	170	175		
cgt gaa gga ggg ttc att cca ttc aag aaa gga gca ttc aat att gca				576
Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala				
180	185	190		
gtt cgt gcg cag att ccc att att cca gtt gta ttc tca gac tat cgg				624
Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg				
195	200	205		
gat ttc tac tca aag cca ggc cga tat ttc aag aat gat gga gaa gtt				672
Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val				
210	215	220		
gtt att cga gtt ctg gat gcg att cca aca aaa ggg ctc act ctt gat				720
Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp				
225	230	235	240	
gac gtc agc gag ttg tct gat atg tgt cgg gac gtt atg ttg gca gcc				768
Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala				
245	250	255		
tat aag gaa gtt act cta gaa gct cag caa cga aat gcg aca cgg cgt				816
Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg				
260	265	270		
gga gaa aca aaa gac ggg aag aaa tct gag taa				849
Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser Glu				
275	280			

<210> 43

<211> 282

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 43

Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu				
1	5	10	15	
Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Val Arg Ile				
20	25	30		
Ser Phe Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val				

35	40	45
Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe		
50	55	60
His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val		
65	70	75
Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys		
85	90	95
Asn His Gln Ser Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro		
100	105	110
Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe		
115	120	125
Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr		
130	135	140
Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met		
145	150	155
Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Asn		
165	170	175
Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala		
180	185	190
Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg		
195	200	205
Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val		
210	215	220
Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp		
225	230	235
Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala		
245	250	255
Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg		
260	265	270
Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser Glu		
275	280	

<210> 44

<211> 849

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(849)

<223> *Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase*

<400> 44

atg gag aac ttc tgg tcg atc gtc gtg ttt ttt cta ctc tca att ctc	48
Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu	
1 5 10 15	
ttc att tta tat aac ata tcg aca gta tgc cac tac tat atg cgg att	96
Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Met Arg Ile	
20 25 30	
tcg ttt tat tac ttc aca att tta ttg cat gga atg gaa gtt tgt gtt	144
Ser Phe Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val	

35	40	45	
aca atg atc cct tct tgg cta aat ggg aag ggt gct gat tac gtg ttt			192
Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe			
50	55	60	
cac tcg ttt ttc tat tgg tgt aaa tgg act ggt gtt cat aca aca gtc			240
His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val			
65	70	75	80
tat gga tat gaa aaa aca caa gtt gaa ggt ccg gcc gta gtt att tgt			288
Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys			
85	90	95	
aat cat cag ggt tct ctc gac att cta tcg atg gca tca atc tgg ccg			336
Asn His Gln Gly Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro			
100	105	110	
aag aat tgt gtt gta atg atg aaa cga att ctt gcc tat gtt cca ttc			384
Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe			
115	120	125	
ttc aat ctc gga gcc tac ttt tcc aac aca atc ttc atc gat cga tat			432
Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr			
130	135	140	
aac cgt gaa cgt gcg atg gct tca gtt gat tat tgt gca tct gaa atg			480
Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met			
145	150	155	160
aag aac aga aat ctt aaa ctt tgg gta ttt ccg gaa gga aca aga aat			528
Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Asn			
165	170	175	
cgt gaa gga ggg ttc att cca ttc aag aaa gga gca ttc aat att gca			576
Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala			
180	185	190	
gtt cgt gcg cag att ccc att att cca gtt gta ttc tca gac tat cgg			624
Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg			
195	200	205	
gat ttc tac tca aag cca ggc cga tat ttc aag aat gat gga gaa gtt			672
Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val			
210	215	220	
gtt att cga gtt ctg gat gcg att cca aca aaa ggg ctc act ctt gat			720
Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp			
225	230	235	240
gac gtc agc gag ttg tct gat atg tgt cgg gac gtt atg ttg gca gcc			768
Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala			
245	250	255	
tat aag gaa gtt act cta gaa gct cag caa cga aat gcg aca cgg cgt			816
Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg			
260	265	270	
gga gaa aca aaa gac ggg aag aaa tct gag taa			849
Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser Glu			
275	280		

<210> 45

<211> 282

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 45

Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu
 1 5 10 15
 Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Met Arg Ile
 20 25 30
 Ser Phe Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val
 35 40 45
 Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe
 50 55 60
 His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys
 85 90 95
 Asn His Gln Gly Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro
 100 105 110
 Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe
 115 120 125
 Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr
 130 135 140
 Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met
 145 150 155 160
 Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Asn
 165 170 175
 Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala
 180 185 190
 Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg
 195 200 205
 Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val
 210 215 220
 Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp
 225 230 235 240
 Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala
 245 250 255
 Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg
 260 265 270
 Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser Glu
 275 280

<210> 46

<211> 1578

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1578)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 46

atg gta ttc gcg ggc ggt gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac
 Met Val Phe Ala Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
 1 5 10 15

55

atc gac gtc gag cac att gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe 20 25 30	96
agt tat gtg tct tca act gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln 35 40 45	144
cct ttg aag cgc ctg acg agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala 50 55 60	192
gtg caa tgt ata tca gct gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly 65 70 75 80	240
act gcg gag gca ctc gca gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg 85 90 95	288
tca tct cag tgg aag aag tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta Ser Ser Gln Trp Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val 100 105 110	336
cac aac aag cca agc gat tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr 115 120 125	384
gat gtt tcc aat ttt gcg gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser 130 135 140	432
act tat ttt gga cga gac ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala 145 150 155 160	480
gct tct aca tgg aaa att ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu 165 170 175	528
agg gtg gag ccg act cca gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg 180 185 190	576
gct ctt ttc ctg agg gag caa ctt ttc aaa agt tcg aaa ttg tac tat Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr 195 200 205	624
gtt atg aag ctg ctc acg aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala 210 215 220	672
ata ata tgt tgg agc aag act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys 225 230 235 240	720
atg atg gct ctg tgt ttc caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe 245 250 255	768
ctc cac aat cag gtg ttt gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly 260 265 270	816
tat gtg atc ggc aac gcc gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys 275 280 285	864
gag aag cat aac ctt cat cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr 290 295 300	912

56

tac caa cca att gat gaa gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg	960
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp	
305 310 315 320	
agc aag gac ata ctg gcc aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc	1008
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile	
325 330 335	
ctc caa tac cag cat ctg ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt	1056
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg	
340 345 350	
ggt agt tgg ctc ttt tgg agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc	1104
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu	
355 360 365	
tca cct gtc gac agg ttg ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac	1152
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr	
370 375 380	
ttt tgg ttc gtc ggg aca gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca	1200
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro	
385 390 395 400	
tta gta tgg atg gcg gtg act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc	1248
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly	
405 410 415	
ttt gta ttt gta ctt agc cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct	1296
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser	
420 425 430	
aaa gaa ttc gtg agt gca cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga	1344
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly	
435 440 445	
aac ata ttc aac gac tgg ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag	1392
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu	
450 455 460	
cat cat ctt ttc cca aca atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca	1440
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala	
465 470 475 480	
cct aga gtg gag gtg ttc tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac	1488
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp	
485 490 495	
gta tct att gct acc ggc act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa	1536
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu	
500 505 510	
gtc gcg gag gct gcg gca gag cag cat gct acc acc agt taa	1578
Val Ala Glu Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser	
515 520 525	

<210> 47

<211> 525

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 47

Met Val Phe Ala Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn	
1 5 10 15	
Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe	

20	25	30
Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln		
35	40	45
Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala		
50	55	60
Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly		
65	70	75
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg		
85	90	95
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val		
100	105	110
His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr		
115	120	125
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser		
130	135	140
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala		
145	150	155
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu		
165	170	175
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg		
180	185	190
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr		
195	200	205
Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala		
210	215	220
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys		
225	230	235
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe		
245	250	255
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly		
260	265	270
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys		
275	280	285
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr		
290	295	300
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp		
305	310	315
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile		
325	330	335
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg		
340	345	350
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu		
355	360	365
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr		
370	375	380
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro		
385	390	395
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly		
405	410	415
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser		
420	425	430
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly		
435	440	445
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu		

58

450	455	460
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala		
465	470	475
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp		480
485	490	495
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu		
500	505	510
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser		
515	520	525

<210> 48

<211> 1192

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (58)...(930)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 48

ctgcttcgtc tcatcttggg ggtgtgattc gggagtggtt tgagttgggt gaggcgca	57
atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg	105
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser	
1 5 10 15	
cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt ggg gtg gag ttg acg gat	153
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp	
20 25 30	
acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt gac agt ccc aca ccc atc	201
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile	
35 40 45	
gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att gtc att gga ggg ctt ttg	249
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu	
50 55 60	
tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc gcc tcg gag cca ttt ttg	297
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu	
65 70 75 80	
ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg ttc tgt ttt gcg ctc agt	345
Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser	
85 90 95	
ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag gct att acc tgg cgg tac	393
Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr	
100 105 110	
tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa cat aaa gag atg gcg att	441
Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile	
115 120 125	
ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac gtg gaa ttc atg gat acc	489
Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr	
130 135 140	
gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg caa ata agc ttc ctc cac	537
Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His	
145 150 155 160	

59

gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att tgg tgg gct att gct cat	585
Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His	
165 170 175	
cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct gcg gct ctg aac tca gga	633
His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly	
180 185 190	
gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc ttg gct gcc tgc ctt cga	681
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg	
195 200 205	
agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt ttt tgg ggc agg tac ttg	729
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu	
210 215 220	
aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg aac tta gtg cag gct tac	777
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr	
225 230 235 240	
tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att	825
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile	
245 250 255	
ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac	873
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr	
260 265 270	
gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa	921
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys	
275 280 285	
act gag tga gctgtatcaa gccatagaaa ctctattatg ttagaacctg	970
Thr Glu	
290	
aagtttgtc tttcttatct ccacttatct tttaagcagc atcagtttg aaatgatgtg	1030
tggcggtgt ctgcaagtag tcataat aatcgccctg agcacttcag atggattgtt	1090
agaacatgag taaaagcggt tattacggtg tttatttgt accaaatcac cgcacgggtg	1150
aattgaaata ttccagattt gatcaatttc atctgaaaaaa aa	1192

<210> 49

<211> 290

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 49

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser	
1 5 10 15	
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp	
20 25 30	
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile	
35 40 45	
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu	
50 55 60	
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu	
65 70 75 80	
Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser	
85 90 95	
Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr	
100 105 110	

60

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125
 Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140
 Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160
 Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175
 His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
 180 185 190
 Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
 195 200 205
 Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
 210 215 220
 Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285
 Thr Glu
 290

<210> 50

<211> 1410

<212> DNA

<213> Phaeodactylum tricorntatum

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1410)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 50

atg gct ccg gat gcg gat aag ctt cga caa cgc cag acg act gcg gta	48
Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val	
1 5 10 15	
gcg aag cac aat gct gct acc ata tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt	96
Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser	
20 25 30	
ctg tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa gtc tgc atc gac gga atc atc tat	144
Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr	
35 40 45	
gac ctc caa tca ttc gat cat ccc ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt	192
Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe	
50 55 60	
ggt ggc aac gat gtc act gta cag tac aag atg att cac ccg tac cat	240
Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His	
65 70 75 80	
acc gag aag cat ttg gaa aag atg aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat	288

61

Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp			
85	90	95	
ttc gtc tgc gag tac aag ttc gat acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa			336
Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys			
100	105	110	
cga gaa gtc ttc aag att gtg cga cga ggc aag gat ttc ggt act ttg			384
Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu			
115	120	125	
gga tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc tac att gcc att ttc ttc tac ctg			432
Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu			
130	135	140	
cag tac cat tgg gtc acc acg gga acc tct tgg ctg ctg gcc gtc gcc			480
Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala			
145	150	155	160
tac gga atc tcc caa gcg atg att ggc atg aat gtc cag cac gat gcc			528
Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala			
165	170	175	
aac cac ggg gcc acc tcc aag cgt ccc tgg gtc aac gac atg cta ggc			576
Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly			
180	185	190	
ctc ggt gcg gat ttt att ggt ggt tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa			624
Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln			
195	200	205	
cac tgg acc cac cac gct tac acc aat cac gcc gag atg gat ccc gat			672
His Trp Thr His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp			
210	215	220	
agc ttt ggt gcc gaa cca atg ctc cta ttc aac gac tat ccc ttg gat			720
Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp			
225	230	235	240
cat ccc gct cgt acc tgg cta cat cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg			768
His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met			
245	250	255	
ccc gtc ttg gct gga tac tgg ttg tcc gct gtc ttc aat cca caa att			816
Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile			
260	265	270	
ctt gac ctc cag caa cgc ggc gca ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac			864
Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp			
275	280	285	
aac gct ttc att cac tcg cga cgc aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct			912
Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala			
290	295	300	
gtg tac att gcg gtg aac gtg att gct ccg ttt tac aca aac tcc ggc			960
Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly			
305	310	315	320
ctc gaa tgg tcc tgg cgt gtc ttt gga aac atc atg ctc atg ggt gtg			1008
Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val			
325	330	335	
gcg gaa tcg ctc gcg ctg gcg gtc ctg ttt tcg ttg tcg cac aat ttc			1056
Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe			
340	345	350	
gaa tcc gcg gat cgc gat ccg acc gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa			1104
Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu			
355	360	365	
cca gtc gac tgg ttc aag aca cag gtc gaa act tcc tgc act tac ggt			1152

62

Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly
 370 375 380
 gga ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa 1200
 Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu
 385 390 395 400
 cac cac ttg ttc cca cgc atg agc agc gct tgg tat ccc tac att gcc 1248
 His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala
 405 410 415
 ccc aag gtc cgc gaa att tgc gcc aaa cac ggc gtc cac tac gcc tac 1296
 Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
 420 425 430
 tac ccg tgg atc cac caa aac ttt ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac 1344
 Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
 435 440 445
 gcg gcc ggg acc ggt gcc aac tgg cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc 1392
 Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
 450 455 460
 ttg acc gga cgg gcg taa 1410
 Leu Thr Gly Arg Ala
 465

<210> 51

<211> 469

<212> PRT

<213> Phaeodactylum tricor nutum

<400> 51

Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe
 50 55 60
 Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His
 65 70 75 80
 Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp
 85 90 95
 Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu
 115 120 125
 Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu
 130 135 140
 Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala
 165 170 175
 Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly
 180 185 190
 Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln

195	200	205
His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp		
210	215	220
Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp		
225	230	235
His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met		
245	250	255
Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile		
260	265	270
Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp		
275	280	285
Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala		
290	295	300
Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly		
305	310	315
Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val		
325	330	335
Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe		
340	345	350
Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu		
355	360	365
Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly		
370	375	380
Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu		
385	390	395
His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala		
405	410	415
Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr		
420	425	430
Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His		
435	440	445
Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro		
450	455	460
Leu Thr Gly Arg Ala		
465		

<210> 52

<211> 3598

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> misc_feature

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor pUC19 dar

<400> 52

tcgcgcgttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtg	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgtggg	aaggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	300

tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttggta	acgccagggt	360	
tttcccagtc	acgacgttgc	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cggcgcccg	agtcctcga	420	
gcaaaattac	acattgccac	taaacgtcta	aacccttgc	atttgtttt	gttttactat	480	
gtgtgttatg	tatttgattt	gcpataaaatt	tttatatttgc	tactaaatttgc	tataacaccc	540	
tttatgctaa	cgtttgc	caacttagcaa	tttgc	gattaatttgc	ttctaaatttgc	600	
tttttgtctt	ctaaatacat	atactaatttca	actggaaat	taatatttgc	ctaataatttgc	660	
tactatagga	gaattaaatgt	gagtgaaat	ggtaccacaa	ggtttggaga	tttaatttgc	720	
gcaatgctgc	atggatggca	tatacacc	acattcaata	attcttgagg	ataataatgg	780	
taccacacaa	gatttgagg	gcatgaaacgt	cacgtggaca	aaaggttttag	taatttttca	840	
agacaacaat	gttaccacac	acaagtttgc	agggtcatgc	atggatgccc	tgtggaaatgt	900	
ttaaaaatat	tttggaaatgt	atttgc	atgc	aaagccatgt	taaaaccatg	960	
ggaggatgca	ataatgaaga	aaactacaaa	tttacatgca	actagttatgc	catgtatgtct	1020	
atataatgag	gattttgc	taacttcatt	catacacact	cactaagt	tacacgatta	1080	
taatttcttc	atagccagcc	caccgcgt	ggcggccgc	tgcagtct	aaggcctc	1140	
gcttaatga	gatatgc	acgcctat	tcgcatgata	tttgc	tttca	1200	
gcacgttgc	aaaaacctg	gcatgtgt	ctcagat	taccgc	gttcat	1260	
tctaataat	atatcacc	ttactatcgt	attttgc	ataatatttgc	ccgttca	1320	
tactgattgt	ccgtgcac	atcgac	ggcgc	gcttgc	atcatgg	1380	
tagctttc	ctgtgt	aaatcc	ctcacaat	cacacaacat	acgagccg	1440	
agcataaaatgt	gtaaagc	gggtgc	ctaa	tgagtgag	aactcacatt	1500	
cgctcactgc	ccgc	tttcc	gtcgg	aaac	ctgtcgt	agctgc	1560
caacgcgc	ggagaggc	tttgc	gtt	ggcg	ctt	ccgctt	1620
tcgctgc	cggtc	tttgc	gtc	ggcgc	gcttgc	actg	1680
cggttatc	cagaatc	agg	ggataac	gaa	aga	acttgc	1740
aaggcc	accgt	aaaa	ggcc	cg	tttgc	tttgc	1800
gacgagc	atc	aaaaat	acg	c	tttgc	tttgc	1860
agataacc	cgtt	cccc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1920
cttaccggat	ac	ctt	tc	gg	aa	gg	1980
cgctgt	taggt	at	tc	tg	gg	gg	2040
cccc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2100
gtaa	ag	cc	cc	cc	cc	cc	2160
ac	tt	at	tc	gt	cc	cc	2220
tatgt	aggcg	gt	gt	ct	gg	gg	2280
ac	at	tc	tc	tc	tc	tc	2340
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2400
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2460
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2520
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2580
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2640
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2700
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2760
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2820
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2880
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2940
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3000
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3060
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3120
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3180
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3240
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3300
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3360
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3420
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3480
tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3540

65

cagaaaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt gatctttct acgggtctg acgctca gtcg 2400
 gaacgaaaac tcacgtaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcacca 2460
 gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatataatg agtaaaactg 2520
 gtctgacagt taccatgtc taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctattcg 2580
 ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc 2640
 atctggcccc agtgcgtcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttac 2700
 agcaataaaac cagccagccg gaaggccga gcgcagaagt ggtctgtcaa ctttatccgc 2760
 ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 2820
 tttgcgcaac gttgttgcctt ttgctacagg catcggtg tcacgctcg cgtttggtat 2880
 ggcttcattc agctccgggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgc 2940
 caaaaaagcg gttagctcct tcggccctcc gatcggttgc agaagtaagt tggccgcagt 3000
 gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattcttt actgtcatgc catccgtaag 3060
 atgctttct gtgactgggt agtactcaac caagtcatcc tgagaatagt gtatgcggcg 3120
 accgagttgc tcttgcggg cgtcaataacg ggataatacc gcgcacata gcagaactt 3180
 aaaagtgc tcattggaa aacgttcttc gggcgaaaaa ctctcaagga tcttaccgct 3240
 gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgaccccaac tgatcttcg catctttac 3300
 tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaaac aggaaggcaa aatgccgaa aaaaggaaat 3360
 aaggccgaca cggaaatgtt gaataactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat 3420
 ttatcagggt tattgtctca tgagccgata catattttaga tgtatattaa aaaaataaaca 3480
 aataggggtt ccgcgcacat ttcccgaaaa agtgcacact gacgtctaag aaaccattat 3540
 tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcactgagg cccttcgtc 3590

<210> 54

<211> 3584

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> misc_feature

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche Promotor-Terminator-Expressionskette in Vektor pUC19 dar

<400> 54

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta 60
 cagcttgtct gtaagcgat gccggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcggtg 120
 ttggcggtt tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgtt ctgagagtgc 180
 accatatgcg gtgtgaaata cgcacagat gcgttaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
 attcgcatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tttcgctat 300
 tacgcccagct ggcgaaaagggg ggtatgtctg caaggcgatt aagttggta acgccagggt 360
 tttcccaagtc acgacgttgtt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcccg agctcctcg 420
 gcaaattttac acattgccac taaacgtcta aacccttgcattttttt gttttactat 480
 gtgtgtttagt tatttgattt gcgataaaatt tttatattttt gtactaaatt tataacacct 540
 tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatata 600
 tttttgtctt ctaaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttgc ttaatatttc 660
 tactatagga gaattaaaagt ggttgcattt ggttgcaccaa ggtttggaga tttaattttt 720
 gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
 taccacacaa gatttgagggt gcatgaacgt cacgtggaca aaagggttttag taattttca 840
 agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatttgc atggatgccc tttggaaatgt 900
 ttaaaaaat tttggaaatgtt atttgcattt ggttgcaccaa ggtttggaga tttaattttt 960
 ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa tttatcatgca actgtttagt catgttagtct 1020
 atataatgatg gattttgcattt tactttcattt catacacact cactaagttt tacacgatca 1080
 taatttcttc atagccagca gatctgcggg catcgatccc gggccatggc ctgttttaat 1140

gagatatgcg agacgcctat gatgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgtt	1200
taaaaaacct gaggcatgtg agctcagatc cttaccggcg gtttcgggttc attctaatga	1260
atataatcacc cgtaactatc gtatTTTtat gaataatatt ctccggtcaa tttaactgatt	1320
gtccgtcgac gagctcgccg cgccaaagctt ggcgtaatca tggcatatgc tgTTTCCGT	1380
gtgaaattgt tatccgctca caatccaca caacatacga gccgaaagca taaaagttaa	1440
agcctgggt gcctaatgag tgagctaaact cacattaatt gcgttgcgt cactgcccgc	1500
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac ggcggggag	1560
aggcggtttg cgtattggc gctttccgc ttccctcgctc actgactcgc tgcgctcggt	1620
cgttccggctg cggcgagccg tatacgctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga	1680
atcagggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg	1740
taaaaaggcc gcgttgcgg cgTTTTCCA taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa	1800
aaatcgacgc tcaagtcaaaa ggtggcggaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt	1860
tccccctgga agctccctcg tgcgtctcc tttccgacc ctgcgcgtt ccggataacct	1920
gtccgcctt ctccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcagct gtaggtatct	1980
cagttccggtaggtcgtagtgcgtt gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc cgttccagcc	2040
cgaccgcgtgc gccttatccg gtaactatcg tctttagtcc aaccggtaa gacacgactt	2100
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc	2160
tacagagtcc ttgaagtgtt ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat	2220
ctgcgtctcg ctgaagccag ttacccctgg aaaaagagtt ggtagctt gatccggcaa	2280
acaaaccacc gctggtagcg gtggTTTTT ttttgcag cagcagatta cgcgcagaaa	2340
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggAACGA	2400
aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct	2460
tttaaattaa aaatgaagg ttaaatcaat cttaaagtata tatgagtaaa cttggctgaa	2520
cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttgcgttcatc	2580
catagttgcc tgactccccg tcgttagat aactacgata cgggagggtt taccatctgg	2640
ccccagtgc gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccc gctccagatt tatcagcaat	2700
aaaccagcca gccggaaaggcccgagcag aagtggctt gcaactttat ccgcctccat	2760
ccagtcattt aattgttggc gggaaagcttagt aactgtatgatc tgcgcgttta atagttgcg	2820
caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttt gtatggcttc	2880
attcagctcc gttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgcacaaaa	2940
agcggttagc ttcccggtc ctccgatcgt tgcgttgcg aagtggccg cagtgttata	3000
actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgcattccg taagatgtt	3060
ttctgtgact ggtgagtagt caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag	3120
ttgcgttgc ccggcgtcaa tacggataa taccgcgcacatcagcagaa ctttaaaagt	3180
gctcatcatt gaaaaacgtt ttccggcgaaaactctca aggatcttac cgctgttgc	3240
atccagttcg atgtacccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac	3300
cagcgtttct gggtagccaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataaggc	3360
gacacggaaa ttgttgcatac tcataactttt ctttttcaa tattttgaa gcatttatca	3420
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg	3480
ggttccgcgc acattttcccc gaaaagtgc acctgacgtc taagaaacca ttatttatcat	3540
gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggccctt cgtc	3584

<210> 55

<211> 4507

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> misc_feature

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor pUC19 dar

<400> 55

tcgcgcgttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	60
cagctgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cgccatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgcatt	caggctgcgc	aactgtggg	aaggcgcate	ggtgcgggccc	tcttcgctat	300
tacgcagct	ggcggaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttggta	acgccaggg	360
tttcccgatc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	cggcgcggccg	agtcctcga	420
gcaaatttac	acattgcccc	taaacgtcta	aacccttgcata	atttgcgtttt	gttttactat	480
gtgtgttatg	tatttgattt	gctataattt	tttatatttgc	gtactaaattt	tataacaccc	540
tttatgtcaa	cgtttgccaa	cacttagcaa	tttgcgaaattt	gattaatttgc	ttctaaattt	600
ttttgtctt	ctaaatacat	atactaata	actggaaatg	taaatatttgc	ctaataatttgc	660
tactatagg	gaattttaagt	gagtgaat	ggtaccacaa	ggttggaga	tttaatttgc	720
gcaatgctgc	atggatggca	tatacacca	acattcaata	attcttgcagg	ataataatgg	780
taccacacaa	gatttgagggt	gcatgaacgt	cacgtggaca	aaagtttag	taatttttca	840
agacaacaat	gttaccacac	acaagttttg	aggtgcacgc	atggatgcgg	tgtggaaagt	900
ttaaaaat	tttggaaatg	atttgcatttgc	aagccatgtg	taaaaaccatg	acatccactt	960
ggaggatgca	ataatgaaga	aaactacaaa	tttacatgca	actagttatg	catgtatgtct	1020
atataatgag	gattttgca	tactttcatt	catacacact	cactaagttt	tacacgatta	1080
taatttcttc	atagccagcc	caccgcgtg	ggcggccggcc	tgcagtctag	aaggcctcct	1140
gcttaatga	gatatgcgag	acgcctatga	tcgcatgata	tttgcgtttca	attctgttgt	1200
gcacgttgc	aaaaacctga	gcatgtgttag	ctcagatcct	taccgcgg	ttcggttcat	1260
tctaataat	atatcaccac	ttactatcgt	atttttatgta	ataatatttgc	ccgttcaatt	1320
tactgattgt	ccgtcgagca	aatttacaca	ttgcccactaa	acgtctaaac	ccttgcattt	1380
tgttttgc	ttactatgtg	tggttatgtat	ttgatgtcg	ataaattttt	atattttgtt	1440
ctaaatttt	aacacctttt	atgctaacgt	ttgccaacac	tttagcaattt	gcaagttgt	1500
taatttgcatt	taaattttttt	ttgttctca	aatacatata	ctaataact	ggaaatgtaa	1560
atatttgcata	atatttctac	tataggagaa	ttaaagttag	tgaatatgg	accacaaggt	1620
ttggagattt	atttgcata	atgctgcatt	gatggcatt	acacaaacaa	ttcaataattt	1680
tttgaggata	ataatggat	cacacaagat	ttgaggtgca	tgaacgtcac	gtggacaaaa	1740
ggtttagtaa	tttttcaaga	caacaatgtt	accacacaca	agttttgagg	tgcattgcatt	1800
gatgcctgt	ggaaagttt	aaaatattttt	ggaaatgatt	tgcattgaa	ccatgtgtaa	1860
aaccatgaca	tccacttgg	ggatgcaata	atgaagaaaa	ctacaaattt	acatgcaact	1920
agttatgcatt	gtatgtatata	taatgaggat	tttgcataata	tttatttgcatt	acacactcac	1980
taagttttac	acgattataa	tttcttcata	gccagcggat	ccgatatcgg	gcccgcctagc	2040
gttaaccctg	ctttaatgag	atatgcgaga	cgccatgtat	cgcatgata	ttgctttca	2100
ttctgttgt	cacgttgcata	aaaacctgag	catgtgttagc	tcagatcctt	accgcgg	2160
tcgggttcat	ctaataat	tatcaccgt	tactatcgt	tttttatgaa	taatatttgc	2220
cgttcaattt	actgattgtc	cgtcgacgaa	ttcgagctcg	gcccgccttgc	cttggcgtaa	2280
tcatgttcat	agctgtttcc	tgtgtgaaat	tttgcatttgc	tcacaaatttcc	acacaaacata	2340
cgagccggaa	gcataaaatgt	taaagccctgg	ggtgcctaat	gagttagtgc	actcacat	2400
attgcgttgc	gctactgtcc	cgcttccag	tcgggaaacc	tgcgtgcata	gctgcattaa	2460
tgaatcgcc	aacgcgcgg	gagaggcggt	ttgcgtatttgc	ggcgccttcc	cgcttcctcg	2520
ctcaactgact	cgctgcgcctc	ggtcgttgcgg	ctgcggcgag	cggtatcgc	tcactcaaag	2580
gcccgtataac	gtttatccac	agaatcagg	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagaaaa	2640
ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	tggcggtttt	ccatagggtc	2700
cgcggccctg	acgagcatca	aaaaatcga	cgctcaagtc	agaggtggcg	aaacccgaca	2760
ggactataaa	gataccaggc	gtttccctt	ggaagctccc	tcgtgcgc	tcctgttccg	2820
accctgcgc	ttaccggata	cctgtccgc	tttctccctt	cggttgcgt	ggcgccttct	2880
catagctcac	gctgttaggt	tctcagttcg	gtgttaggtcg	ttcgccttca	gctgggctgt	2940
gtgcacgaa	cccccggttca	gcccgcaccgc	tcgcgcctt	ccggttacta	tcgttgcgt	3000
tccaaaccgg	taagacacga	ttatgcaca	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattac	3060
agagcgaggt	atgttaggcgg	tgctacagag	ttcttgcgt	ggtggcctaa	ctacggctac	3120
actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgt	ctgctgaagc	cagtacctt	cgaaaaaga	3180

69

gttggtagct	cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	gcggtggttt	ttttgtttgc	3240
aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	atccttgc	ctttctacg	3300
gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaactca	cgttaaggg	tttggcat	gagattatca	3360
aaaaggatct	tcaccttagat	cctttaaat	taaaaatgaa	gttttaatc	aatctaaagt	3420
atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	caatgctaa	tcagtgggc	acctatctca	3480
gcgatctgtc	tatccgttc	atccatagtt	gcctgactcc	ccgtcggtga	gataactacg	3540
atacgggagg	gcttaccatc	tggcccccagt	gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgctca	3600
ccggctccag	atttatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	ggggcggcgcg	cagaagtgg	3660
cctgcaactt	tatccgcctc	catcagttct	attaattgtt	gcggggaaagc	tagagtaagt	3720
agttcgccag	ttaatagttt	gcgcacgtt	gttgcatttg	ctacaggcat	cgtgggtgtca	3780
cgctcgctgt	ttggtatggc	ttcattcagc	tccggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	3840
tgatccccca	tgttgtgcaa	aaaagcggtt	agctccttcg	gtcctccgat	cgttgtcaga	3900
agtaagttgg	ccgcagtgtt	atcactcatg	gttatggcag	cactgcataa	ttctcttact	3960
gtcatgccat	ccgtaagatg	ctttctgtg	actggtgagt	actcaaccaa	gtcattctga	4020
gaatagtgtt	tgcggcgcacc	gagttgctct	tgcccgccgt	caatacggga	taataccgcg	4080
ccacatagca	gaactttaaa	agtgcctatc	attggaaaac	gttcttcggg	gcgaaaactc	4140
tcaaggatct	taccgcttt	gagatccagt	tcgatgtaac	ccactcggtc	acccaactga	4200
tcttcagcat	cttttacttt	caccagcggt	tctgggtgag	caaaaacagg	aaggcaaaat	4260
gccgaaaaaaaa	agggaataag	ggcgcacacgg	aaatgttcaa	tactcatact	cttccttttt	4320
caatattatt	gaagcattta	tcagggttat	tgtctcatga	gcggatacat	atttgaatgt	4380
attttagaaaa	ataaaacaaat	aggggttccg	cgcacatttc	cccgaaaagt	gccacctgac	4440
gtctaagaaa	ccattattat	catgacattta	acctataaaa	ataggcgtat	cacgaggccc	4500
tttcgtc						4507

<210> 56

<211> 17752

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*, *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (11543)..(12415)

<223> Delta-6-Elongase

<220>

<221> CDS

<222> (13313)..(14890)

<223> Delta-6-Desaturase

<220>

<221> CDS

<222> (15791)..(17200)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 56

gatctggcgc	cggccagcga	gacgagcaag	attggccgccc	gcccggaaacg	atccgacagc	60
gcgcggcggca	caggtgcgcga	ggcaatttgc	accaacgcatt	acagcggccag	cagaatgcga	120
tagtggccgg	tgacgtcggt	cgagtgaacc	agatcgccga	ggaggcccg	cagcaccggc	180
ataatcaggc	cgatgcccac	agcgtcgagc	gcgcacgtgc	tcagaattac	gatcagggt	240
atgttgggtt	tcacgtctgg	cctccggacc	agcctccgct	ggtccgattt	aacgcgcgga	300
ttctttatca	ctgataagtt	ggtgacata	ttatgtttat	cagtataaaa	gtgtcaagca	360
tgacaaaagtt	gcagccgaat	acagtgttcc	gtgcccgcct	ggacctgttg	aacgaggct	420

attgggtaat gactccaact tattgatagt gtttatgtt cagataatgc ccgatgactt	3720
tgtcatgcag ctccaccat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccgac cgtgccagg	3780
gctgcctcag attcaggta tgccgctcaa ttgcgtcgat atatcgcttg ctgattacgt	3840
gcagcttcc cttcaggcgg gattcataca gcccgcagcc atccgtcatc catatcacca	3900
cgtcaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcg cgccatagtg cggtcacccga	3960
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc	4020
gcgatttagc cccgacatag ccccaactgtt cgtccatttc cgccagacg atgacgtcac	4080
tgcccgctg tatgcgcgag gttaccgact gcccgcgtgatgtt gacgtaaaat	4140
cgtgtgagg ccaacgccc taatgcggc tggttgcggc catccaacgc cattcatggc	4200
cataatcaatg attttctggc gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg	4260
ccatgtttta cggcagttag agcagagata ggcgtatgtt ccggcggtgc ttttgcgtt	4320
acgcaccacc cccgtcgttag ctgaacacagg gggacagctg atagacacag aagccactgg	4380
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagaatgtt ggcagcatca cccataattg	4440
tggttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgc aactttgaaa acaactttga	4500
aaaagctgtt ttctggatt taaggttta gaatgcagg aacagtgaat tggagttcgt	4560
cttggtaaa ttagcttctt ggggtatctt taaaatactgt agaaaagagg aaggaaataa	4620
taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc	4680
gtaaaagata cggaaaggaa gtctctgtc aaggtatata agctggggg agaaaatgaa	4740
aacctatatt taaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tggaaacgg	4800
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcactt	4860
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtggg ccgatggcgt cctttgctcg	4920
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac	4980
aggcttttc actccatcga catatcgat tggccctata cgaatagctt agacagccgc	5040
ttagccaaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattt cgaaaaactgg	5100
gaagaagaca ctccattaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaaa gacggaaaag	5160
cccgaaagagg aacttgttctt ttcccacggc gacctggggg acagcaacat ctttgtgaaa	5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcaggcgga caagtggat	5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggagaaca gtatgtcgag	5340
ctatttttg attactggg gatcaaggctt gattgggggaaataaaaata ttatattta	5400
ctggatgaat tggtagtgcctt cctagatgtc ggcgaacat gcccgcgaca agcaggagcg	5460
caccgacttc ttccgcacca agtgtttgg ctctcaggccc gaggcccacg gcaagtattt	5520
gggcaagggg tcgctggat tcgtgcaggc caagattcgg aataccaagt acgagaaggaa	5580
cggccagacg gtctacggg cccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa	5640
ggcaccaggc gggtaaaatc aggaataagg gcacattgcc cccgcgtgag tggggcaat	5700
cccgcaaggg gggtaatgt atcggacgtt tgaccggaaag gcatacaggc aagaactgtat	5760
cgacgcgggg ttttccggc aggtgcgc aaccatgcgc agccgcaccc tcattgcgtgc	5820
gccccgcgaa accttccatg cccgtcgatc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga	5880
gcccgcacgc gtgcacactgg ctccccctgc cctggccgcg ccattggccg ccgtggagcg	5940
ttcgcgtcgat ctcgaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgc	6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cggccggcgg gacctggcaa aacaggtcag	6060
cgaggccaaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcagcagatcaagg aatgcagct	6120
ttccttggttc gatattgcgc cgtggccggc cacgatgcgc gcgatgcca acgacacggc	6180
ccgctctgccc ctgttccatca cccgcaccaaaa gaaaatcccg cccgcggcgc tgcaaaacaa	6240
ggtcatatcc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgatcg agctgcgggc	6300
cgacgtgac gaactgggtt ggcagcagg gttggagtac gcgaaacgc cccctatcg	6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgcggcggc ctgggtcgatcgatcaatgg	6420
ccggattttac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt	6480
cacgtccgac cccgcgtggc acctggaaatc ggtgtcgatcg ctgcaccgc tccgcgtcc	6540
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcgc ggtcctgatc gacgaggaaa tgcgtcgatcg	6600
gtttgcgtgc gaccactaca cggaaatccat atgggagaag taccgcacgc tgtcgcgc	6660
ggccgcacgg atgttcgact atttcagtc gcaccgggg ccgtaccgc tcaagctggaa	6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcgatc caccgcgtg aagaagttggc gcgagcagg	6780
ccggcgaaagcc tgcaagagtttgcgaggcag cggcctgggtt gacacacgc tgggtcaatga	6840
tgacctgggttgc cattgcacaaat gcttagggcct tgcgtgggtca gttccggctt ggggttcagc	6900

agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcaact gctcgacgca cttgcttcgc	6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaaacag aggattaaaa	7020
ttgacaattt tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc	7080
cgcgagatcc gattgtcgcc cctgaagaaa gtcagaga tgttcgggtc cgtttacgag	7140
cacgaggaga aaaagcccat ggagggcggtc gtcgacacggt tgcgagatgc cgtggcattc	7200
ggcgcttaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggtct tcaaaccagga ggacggcccc	7260
aaggacgctc acaaaggcga tctgtccggc gtttctgtgg agcccaaca gcgaggccga	7320
ggggtcgccc gtatgctgt gcggggcggtt cggcggggtt tattgctgt gatgatcgctc	7380
cgacagattc caacggaaat ctggggatg cgcacatctca tcctcgccgc acttaatatt	7440
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccggc tgccgggggg ggtcgccg	7500
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgcccgtct gctaggtac	7560
ccgatacgt ttagtggcggt cctggggctt atttgcggaa ctgcggcggt ggcgtgttgg	7620
gtgttgcacac caaaacgcagg gctagatcct gtcggcgctc cagcggggcct ggccggggcg	7680
gtttccatgg cggtcgaaac cgtgctgacc cgcaagtggc aaccccccgt gcctctgc	7740
acctttaccc cctggcaact ggccggccgg a gacttctgc tcgttccagt agctttatgt	7800
tttgcattccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcg	7860
ctgatcgagg cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgactc acgtcaac	7920
acagttgttt ctttactggg ctttcctc cccagatctg gggtcgatca gcccggggatg	7980
catcaggccc acagtcggaa ctgcgggtcc cgcacctgtt ccattcgggtg agcaatggat	8040
agggggatgg atatcgtaa cgttcaacttc taaaagaaata ggcgcactca gtttcctcag	8100
cggttttac cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagccgtc	8160
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggg tctctcgag ggagatgata	8220
tttgcattcaca ggcagcaacg ctctgtcattc gttacaatca acatgttacc ctccgcgaga	8280
tcatccgtgt ttcaaaacccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat	8340
gagcaaaatgc tgccgcctta caacgctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgtgggt	8400
gcctgtatcg agtgggtatt ttgtggcgag ctgcccgtc gggagctgtt ggctggctgg	8460
tggcaggata tattgtgggt taaaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattcg	8520
gacgtttta atgtactggg gtgggttttc ttttaccatc tgagacgggc aacagctgt	8580
tgcccttcac cgccctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgc	8640
gcaggcgaaa atccgtttt atgggggttc cgaaatcgcc aaaatccctt ataaatcaa	8700
agaatagccc gagatagggt tgagtgttgc tccagttgg aacaagatc cactattaa	8760
gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg	8820
tgaaccatca cccaaatcaa gtttttggg gtcgagggtgc cgtaaaagcac taaatcg	8880
ccctaaaggg agcccccgtt ttagagcttgc acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa	8940
ggaaggaaag aaagcgaaag gagcgggcgc cattcaggct ggcgaactgt tgggaaggc	9000
gatcgggtgcg ggccttctc ctattacgccc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc	9060
gattaagttt ggttaacgcca gggtttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg	9120
aattaaattcc catcttgcattt gaaatataat ttttattttt attgataaaaa taacaagtc	9180
ggtattatag tccaagcaaa aacataaaatt tattgtatgc agttttaaatt cagaaatatt	9240
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtatgcg aaagactgag tgcgatatt	9300
tgtgttaatac ataaatttgcgat gatatacgta gtttagctca tcggggatc cgtcgaa	9360
agcttgggtc cccgtcgat gaaactcgatc agaaggcgat agaaggcgat ggcgtcgaa	9420
tcgggagcg cgtatccgtt aagcacgagg aagcgggtcag cccattcgcc gccaagctt	9480
tcagcaatat cacgggtatc caacgctatc tcctgtatgc ggtccggccac acccagccgg	9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcgccca tttccacca tgatattcg gcaagcaggca	9600
tcgcatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc ggccttgc ggcgcgaa	9660
agttcggtgc ggcgcgagccc ctgtatgtct tcgtccatgc catcctgtatc gacaagaccg	9720
gcttcatcc ggtacgtgc tcgctcgatg cgatgttgc cttgggtgc gaatgggcag	9780
gtagccggat caagcgatg cagccggcgc attgcgtatc ccatgtatgg tactttctcg	9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgccaa tagcagccag	9900
tccctcccg cttcgtatgc aacgtcgatc acagctcgcc aaggaaacgccc cgtcggtgg	9960
agccacgata gccgcgtgc ctcgtctgc agtttattca gggcaccggc caggtcggtc	10020
ttgacaaaaaa gaaccggggcg cccctcgatc gacagccggc acacggccggc atcagagcag	10080
ccgattgtct gttgtggccca gtcatacgccg aatagctct ccacccaaacgc ggccggagaa	10140

73

cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg agggaaattt atggAACgtc 10260
 agtggagcat ttttacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgactttga 10320
 acgcgcata atggttctg acgtatgtc tttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
 tgagtggtc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
 gtcatcgccg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatcccct 10500
 ggcgcatacg atccttggcg gcaagaaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
 cttaccagag ggcgcggccag ctggcaattc cggttcgtt gctgtccata aaaccgcggc 10620
 gtctagctat ggcgcatacgaa gcccactgca agctacctgc tttcttttgc cgcttgcgtt 10680
 ttcccttgc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
 actggcttgc tacgtgttcc gcttccctta gcagcccttgc gcccctgagtt gcttgcggca 10800
 ggcgtgaagct tgcgtgcgtc caggtcgac ggcgcggcgg ctcctcgagc aaatttacac 10860
 attggccacta aacgtctaaa ccctgttaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgt 10920
 ttgttgc gataaaatttt tataatttggt actaaattta taacacctt tatgctaaacg 10980
 ttggccaaca ctttagcaatt tgcaagttga ttaatttggatt ctaaaattttt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaatgtaa aatatttgc aatatttcta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg ttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
 ttgtgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta attttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagtttttagt gtgcgtgcgtt ggtgccttgc ttggaaagttt aaaaatattt 11340
 ttggaaatgtat ttgcgtggaa gccatgtgtaa aaccatgac atccacttgg aggtatgcaat 11400
 aatgaagaaaa actacaaaatt tacatgcaac tagttatgca tttttctatataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagttta cacgattata atttcttcat 11520
 agccagccca cccgcgggtgaa aa atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag 11572
 Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu
 1 5 10
 ttg gat ggg aag gtc tcg cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt 11620
 Leu Asp Gly Lys Val Ser Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe
 15 20 25
 ggg gtg gag ttg acg gat acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt 11668
 Gly Val Glu Leu Thr Asp Thr Pro Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val
 30 35 40
 gac agt ccc aca ccc atc gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att 11716
 Asp Ser Pro Thr Pro Ile Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile
 45 50 55
 gtc att gga ggg ctt ttg tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc 11764
 Val Ile Gly Gly Leu Leu Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg
 60 65 70
 gcc tcg gag cca ttt ttg ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg 11812
 Ala Ser Glu Pro Phe Leu Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu
 75 80 85 90
 ttc tgt ttt gcg ctc agt ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag 11860
 Phe Cys Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln
 95 100 105
 gct att acc tgg cgg tac tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa 11908
 Ala Ile Thr Trp Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys
 110 115 120
 cat aaa gag atg gcg att ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac 11956
 His Lys Glu Met Ala Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr
 125 130 135
 gtg gaa ttc atg gat acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg 12004
 Val Glu Phe Met Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg
 140 145 150
 caa ata agc ttc ctc cac gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att 12052

Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile
 155 160 165 170
 tgg tgg gct att gct cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct 12100
 Trp Trp Ala Ile Ala His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser
 175 180 185
 gcg gct ctg aac tca gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc 12148
 Ala Ala Leu Asn Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe
 190 195 200
 ttg gct gcc tgc ctt cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt 12196
 Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu
 205 210 215
 ttt tgg ggc agg tac ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg 12244
 Phe Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu
 220 225 230
 aac tta gtg cag gct tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca 12292
 Asn Leu Val Gln Ala Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro
 235 240 245 250
 caa tgg ctg atc aag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt 12340
 Gln Trp Leu Ile Lys Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe
 255 260 265
 ctt ttc ggc aat ttt tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga 12388
 Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly
 270 275 280
 aag caa aag gga gct aaa act gag tga tctagaaggc ctcctgcttt 12435
 Lys Gln Lys Gly Ala Lys Thr Glu
 285 290
 aatgagatat gcgagacgccc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg 12495
 ttgtaaaaaaaaa cctgagcatg ttagtcag atccttaccc cccggtttcgg ttcattctaa 12555
 tgaatatac acccgttact atcgtattt tatgaataat attctccgtt caatttactg 12615
 attgtccgtc gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt 12675
 ttgtttact atgtgtgtta tggatgttataaa ttgttataattt tggtactaaa 12735
 ttataaacac cttttatgct aacgtttgc aacacttagc aatttgcag ttgattaatt 12795
 gattctaaat tattttgttc ttctaaatac atatactaataat caactggaaa tgtaaatatt 12855
 tgctaataatt tctactataag gagaattttt gtgagtgaat atggtaccac aaggtttgaa 12915
 gatttaattt tgcaatgct gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttgc 12975
 ggataataat ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgaa caaaagggttt 13035
 agtaattttt caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcatt gcatggatgc 13095
 cctgtggaaa gttaaaaat atttggaaa tgatttgcat ggaaggccatg tgtaaaaacca 13155
 tgacatccac ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtt 13215
 tgcatgttagt ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctcactaagt 13275
 ttacacgat tataatttct tcatacgccat cggatcc atg gta ttc gcg ggc ggt 13330
 Met Val Phe Ala Gly Gly
 295
 gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att 13378
 Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile
 300 305 310
 gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act 13426
 Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr
 315 320 325
 gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg 13474
 Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr
 330 335 340
 agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct 13522
 Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala

345	350	355	360	
gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca				13570
Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala				
365	370	375		
gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag				13618
Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys				
380	385	390		
tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat				13666
Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp				
395	400	405		
tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg				13714
Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala				
410	415	420		
gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac				13762
Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp				
425	430	435	440	
ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca gct tct aca tgg aaa att				13810
Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala Ala Ser Thr Trp Lys Ile				
445	450	455		
ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag agg gtg gag ccg act cca				13858
Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu Arg Val Glu Pro Thr Pro				
460	465	470		
gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga gct ctt ttc ctg agg gag				13906
Glu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu				
475	480	485		
caa ctt ttc aaa agt tcg aaa ttg tac tat gtt atg aag ctg ctc acg				13954
Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr Val Met Lys Leu Leu Thr				
490	495	500		
aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca ata ata tgt tgg agc aag				14002
Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala Ile Ile Cys Trp Ser Lys				
505	510	515	520	
act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt atg atg gct ctg tgt ttc				14050
Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys Met Met Ala Leu Cys Phe				
525	530	535		
caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttg ctc cac aat cag gtg ttt				14098
Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Phe				
540	545	550		
gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg tat gtg atc ggc aac gcc				14146
Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Gly Asn Ala				
555	560	565		
gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag gag aag cat aac ctt cat				14194
Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys Glu Lys His Asn Leu His				
570	575	580		
cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act tac caa cca att gat gaa				14242
His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Ile Asp Glu				
585	590	595	600	
gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg agc aag gac ata ctg gcc				14290
Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp Ser Lys Asp Ile Leu Ala				
605	610	615		
aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc ctc caa tac cag cat ctg				14338
Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile Leu Gln Tyr Gln His Leu				
620	625	630		
ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt ggt agt tgg ctc ttt tgg				14386
Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg Gly Ser Trp Leu Phe Trp				

635	640	645	
agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc tca cct gtc gac agg ttg			14434
Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu Ser Pro Val Asp Arg Leu			
650	655	660	
ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca			14482
Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr			
665	670	675	680
gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg			14530
Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val			
685	690	695	
act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc			14578
Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser			
700	705	710	
cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct aaa gaa ttc gtg agt gca			14626
His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala			
715	720	725	
cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg			14674
Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp			
730	735	740	
ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca			14722
Phe Thr Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr			
745	750	755	760
atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc			14770
Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe			
765	770	775	
tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc			14818
Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly			
780	785	790	
act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca			14866
Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala			
795	800	805	
gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgtta accctgcttt aatgagat			14920
Glu Gln His Ala Thr Thr Ser			
810	815		
gcgagacgcc tatgatcgca tgatattgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaa			14980
cctgagcatg ttagctcag atccttaccc cccgtttcgg ttcattctaa tgaatatac			15040
accgcgtact atcgtatccc tatgaataat attctccgtt caatttactg attgtccgtc			15100
gagcaaaatcc acacattgcc actaaacgtc taaaacccttg taatttggtt ttgtttact			15160
atgtgtgtta ttagttgttgcataaaa tttttatatt tggactaaa ttataacac			15220
cttttatgttgc aacgtttgcc aacacttagc aatttgcag ttgattaatt gattctaaat			15280
tatttttgtc ttctaaatac atataactaat caactggaaa tgtaaatatt tgctaatatt			15340
tctactatacg gagaattaaa tgagtgaaat atggtaccac aagggttggaa gatttatgg			15400
ttgcaatgtt gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttga ggataataat			15460
ggtaccacac aagatttgag gtgcattaaac gtcacgtggaa caaaagggtt agtaatttt			15520
caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcatt gcatggatgc cctgtggaaa			15580
gtttaaaaat attttgaaa tgatttgcatt ggaagccatg tgtaaaacca tgacatccac			15640
ttggaggatg caataatgaaa gaaaaactaca aatttacatg caactagttt tgcatgttagt			15700
ctatataatg aggatttgc aatacttca ttccatcacaca ctcactaagt ttacacgat			15760
tataatttct tcatagccag cagatctaaa atg gct ccg gat gcg gat aag ctt			15814
820	825	830	835
Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu			
cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg aag cac aat gct gct acc ata			15862
Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile			
825	830	835	

tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa	15910
Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu	
840 845 850 855	
gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac ctc caa tca ttc gat cat ccc	15958
Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro	
860 865 870	
ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt ggc aac gat gtc act gta cag	16006
Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln	
875 880 885	
tac aag atg att cac ccg tac cat acc gag aag cat ttg gaa aag atg	16054
Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met	
890 895 900	
aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc gtc tgc gag tac aag ttc gat	16102
Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp	
905 910 915	
acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga gaa gtc ttc aag att gtg cga	16150
Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg	
920 925 930 935	
cga ggc aag gat ttc ggt act ttg gga tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc	16198
Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys	
940 945 950	
tac att gcc att ttc ttc tac ctg cag tac cat tgg gtc acc acg gga	16246
Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly	
955 960 965	
acc tct tgg ctg ctg gcc gtg gcc tac gga atc tcc caa gcg atg att	16294
Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile	
970 975 980	
ggc atg aat gtc cag cac gat gcc aac cac ggg gcc acc tcc aag cgt	16342
Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg	
985 990 995	
ccc tgg gtc aac gac atg cta ggc ctc ggt gcg gat ttt att ggt	16387
Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly	
1000 1005 1010	
ggt tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa cac tgg acc cac cac gct	16432
Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln His Trp Thr His His Ala	
1015 1020 1025	
tac acc aat cac gcc gag atg gat ccc gat agc ttt ggt gcc gaa	16477
Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp Ser Phe Gly Ala Glu	
1030 1035 1040	
cca atg ctc cta ttc aac gac tat ccc ttg gat cat ccc gct cgt	16522
Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp His Pro Ala Arg	
1045 1050 1055	
acc tgg cta cat cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg ccc gtc ttg	16567
Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met Pro Val Leu	
1060 1065 1070	
gct gga tac tgg ttg tcc gct gtc ttc aat cca caa att ctt gac	16612
Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile Leu Asp	
1075 1080 1085	
ctc cag caa cgc ggc gca ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac aac	16657
Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp Asn	
1090 1095 1100	
gct ttc att cac tcg cga cgc aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct	16702
Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala	
1105 1110 1115	

78

gtg tac att gcg gtg aac	gtg att gct ccg ttt	1120	1125	1130	1135	1140	1145	1150	1155	1160	1165	1170	1175	1180	1185	1190	1195	1200	1205	1210	1215	1220	1225	1230	1235	1240	1245	1250	1255	1260	1265	1270	1275	1280	1285	1290	1295	1300	1305	1310	1315	1320	1325	1330	1335	1340	1345	1350	1355	1360	1365	1370	1375	1380	1385	1390	1395	1400	1405	1410	1415	1420	1425	1430	1435	1440	1445	1450	1455	1460	1465	1470	1475	1480	1485	1490	1495	1500	1505	1510	1515	1520	1525	1530	1535	1540	1545	1550	1555	1560	1565	1570	1575	1580	1585	1590	1595	1600	1605	1610	1615	1620	1625	1630	1635	1640	1645	1650	1655	1660	1665	1670	1675	1680	1685	1690	1695	1700	1705	1710	1715	1720	1725	1730	1735	1740	1745	1750	1755	1760	1765	1770	1775
Val Tyr Ile Ala Val Asn	Val Ile Ala Pro Phe	1120	1125	1130	1135	1140	1145	1150	1155	1160	1165	1170	1175	1180	1185	1190	1195	1200	1205	1210	1215	1220	1225	1230	1235	1240	1245	1250	1255	1260	1265	1270	1275	1280	1285	1290	1295	1300	1305	1310	1315	1320	1325	1330	1335	1340	1345	1350	1355	1360	1365	1370	1375	1380	1385	1390	1395	1400	1405	1410	1415	1420	1425	1430	1435	1440	1445	1450	1455	1460	1465	1470	1475	1480	1485	1490	1495	1500	1505	1510	1515	1520	1525	1530	1535	1540	1545	1550	1555	1560	1565	1570	1575	1580	1585	1590	1595	1600	1605	1610	1615	1620	1625	1630	1635	1640	1645	1650	1655	1660	1665	1670	1675	1680	1685	1690	1695	1700	1705	1710	1715	1720	1725	1730	1735	1740	1745	1750	1755	1760	1765	1770	1775

<210> 57

<211> 290

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum, Physcomitrella patens*

<400> 57

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser	1	5	10	15
---	---	---	----	----

79

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 20 25 30
 Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 35 40 45
 Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60
 Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80
 Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95
 Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110
 Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125
 Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140
 Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160
 Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175
 His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
 180 185 190
 Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
 195 200 205
 Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
 210 215 220
 Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285
 Thr Glu
 290

<210> 58

<211> 525

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum, Physcomitrella patens*

<400> 58

Met Val Phe Ala Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
 1 5 10 15
 Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
 20 25 30
 Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
 35 40 45
 Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
 50 55 60
 Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly

65	70	75	80
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg			
85	90	95	
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val			
100	105	110	
His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr			
115	120	125	
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser			
130	135	140	
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala			
145	150	155	160
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu			
165	170	175	
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg			
180	185	190	
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr			
195	200	205	
Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala			
210	215	220	
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys			
225	230	235	240
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe			
245	250	255	
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly			
260	265	270	
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys			
275	280	285	
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr			
290	295	300	
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp			
305	310	315	320
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile			
325	330	335	
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg			
340	345	350	
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu			
355	360	365	
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr			
370	375	380	
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro			
385	390	395	400
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly			
405	410	415	
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser			
420	425	430	
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly			
435	440	445	
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu			
450	455	460	
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala			
465	470	475	480
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp			
485	490	495	
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu			

500	505	510
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser		
515	520	525

<210> 59

<211> 469

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*, *Physcomitrella patens*

<400> 59

Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe
 50 55 60
 Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His
 65 70 75 80
 Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp
 85 90 95
 Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu
 115 120 125
 Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu
 130 135 140
 Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala
 165 170 175
 Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly
 180 185 190
 Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln
 195 200 205
 His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp
 210 215 220
 Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp
 225 230 235 240
 His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met
 245 250 255
 Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile
 260 265 270
 Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp
 275 280 285
 Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala
 290 295 300
 Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val
 325 330 335

82

Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe
 340 345 350
 Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu
 355 360 365
 Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly
 370 375 380
 Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu
 385 390 395 400
 His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala
 405 410 415
 Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
 420 425 430
 Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
 435 440 445
 Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
 450 455 460
 Leu Thr Gly Arg Ala
 465

<210> 60

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 60

gaattcggcg cgccgagctc ctcgag

26

<210> 61

<211> 265

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 61

ccaccgcgtt gggcgccgc ctgcagtcta gaaggcctcc tgcttaatg agatatgcga 60
 gacgcctatg atcgcatgtat ttgcgttgc aattctgttg tgcacgttgt aaaaaacctg 120
 agcatgtgtatgc gtcagatcc ttaccgcggg ttccgttca ttctaatgaa tatatcaccc 180
 gttactatcg tattttatgc aataatattc tccgttcaat ttactgatttgcgtgcacg 240
 aattcgagct cggcgccca agctt 265

<210> 62

<211> 257

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 62

ggatccgata tcgggccccgc tagcgtaac cctgcttaa tgagatatgc gagacgccta 60
 tgatcgcatg atattgcctt tcaattctgt tgcacgtt gtaaaaaacc tgagcatgtg 120
 tagctcagat ccttaccgcgg gtttcgggtt cattctaatg aatatatcac ccgttactat 180

cgtatTTTA	tgaataatAT	tctccgttca	atttactgat	tgtccgtcga	cgaattcgag	240
ctcgccgc	caagctt					257

<210> 63

<211> 5410

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 63

ttttggaaat	gatttgcacG	gaagccatgt	gtaaaaccat	gacatccact	tggaggatgc	60
aataatgaag	aaaactacaa	atttacatgc	aactagttat	gcatgtagtc	tatataatga	120
ggatTTTgca	atactttcat	tcatacacac	tcactaagtT	ttacacgatt	ataatttctt	180
catagccagc	ggatccgata	tcgggcccgc	tagcgttaac	cctgctttaa	tgagatatgc	240
gagacgccta	tgatcgcatg	atatttgctt	tcaattctgt	tgtgcacgtt	gtaaaaaaacc	300
tgagcatgtg	tagctcagat	ccttaccgcc	ggttccggtt	cattctaattg	aatatatcac	360
ccgttactat	cgtatTTTA	tgaataatAT	tctccgttca	atttactgat	tgtccgtcga	420
gcaaatttac	acattgcccac	taaacgtcta	aacccttgc	atttgcTTTT	gttttactat	480
gtgtgttatg	tatttgattt	gcgataaaatt	tttatatttg	gtactaaatt	tataacacct	540
tttatgctaa	cgtttgccaa	cacttagcaa	tttgc	gattaattga	ttctaaattta	600
ttttgtctt	ctaaatacat	atactaattca	actggaaatg	taaatatttg	ctaataatttc	660
tactatacca	gaattaaagt	gagtgaatat	ggtaccacaa	ggttggaga	tttaattgtt	720
gcaatgctgc	atggatggca	tatacacaa	acattcaata	attcttgagg	ataataatgg	780
taccacacaa	gatttgagg	gcatgaacgt	cacgtggaca	aaaggTTT	taattttca	840
agacaacaat	gttaccacac	acaagtTTT	aggtgcacG	atggatgccc	tgtggaaagt	900
ttaaaaat	tttggaaatg	atttgcacG	aagccatgt	taaaaccatg	acatccactt	960
ggaggatgca	ataatgaaga	aaactacaaa	tttacatgc	actagttatg	catgtatgt	1020
atataatgag	gattttgcaa	tactttcatt	catacacact	cactaagtTTT	tacacgatta	1080
taatttcttc	atagccagca	gatctgccc	catcgatccc	gggccatggc	ctgctttaat	1140
gagatatgcg	agacgcctat	gatcgcatg	tatttgctt	caattctgtt	gtgcacgtt	1200
taaaaaacct	gagcatgtgt	agctcagatc	cttaccgccc	gtttccggtt	attctaattga	1260
atataatcacc	cgttactatc	gtatTTT	taattttat	ctccgttca	tttactgatt	1320
gtccgtcgac	gagctcgccg	cgccaaagctt	ggtcgatata	tggtcatagc	tgtttccctgt	1380
gtgaaattgt	tatccgtca	caattccaca	caacatacga	gcccggaaagca	taaagtgtaa	1440
agcctgggt	gcctaattgag	tgagctaact	cacattaatt	ggttgcgct	cactgcccgc	1500
tttccagtgc	ggaaacactgt	cgtgcacG	gatattatg	atcgccaac	gcccggggag	1560
aggcgtttt	cgtattgggc	gctctccgc	ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	1620
cgttccggctg	cggcgagccg	tatcgatca	ctcaaaggcc	gtaatacgg	tatccacaga	1680
atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgt	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccc	1740
taaaaaggcc	gctgtcg	cgTTT	cccccgtacg	agcatcaca	1800	
aaatcgacgc	tcaagtgc	ggtggcgaaa	cccgacagg	ctataaagat	accaggcg	1860
ccccctgg	agctccctcg	tgcgtctcc	tgttccgacc	ctgcccctt	ccggataact	1920
gtccgcctt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcagct	gtaggatatc	1980
cagttccgg	taggtcg	gctccaaagct	gggctgtgt	cacgaacccc	ccgttcagcc	2040
cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aaccggtaa	gacacgactt	2100
atcgccactg	gcagcagcc	ctggtaacag	gattagcaga	gctgaggat	taggcgg	2160
tacagatTC	ttgaagtgg	ggcctaacta	cggtacact	agaaggacag	tatttggat	2220
ctgcgtctg	ctgaaggcc	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctt	gatccgg	2280
acaaaccacc	gctggtagcg	gtggTTTT	tgttgc	caagcagatta	cgccgcagaaa	2340
aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaaacga	2400
aaactcacgt	taagggattt	ttgtcatgag	attatcaaaa	aggatTTCA	cctagatcct	2460
tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgataaa	cttgg	2520

cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttgcgttcatc 2580
 catagttgcc tgactccccg tcgtgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640
 ccccagtgtc gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccc gctccagatt tattcagcaat 2700
 aaaccagcca gccggaaaggg ccgagcgcag aagtggctt gcaactttat ccgcctccat 2760
 ccagtttatt aatttgtgcc gggaaagctag agtaagtatg tcgcccagtt atagtttgcg 2820
 caacgttgc gccattgtca caggcatcg ggtgtcacgc tcgtcgttt gtagtggcttc 2880
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tggcaaaaaa 2940
 agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaatg aagttggccg cagtgttata 3000
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgcccattcg taagatgttt 3060
 ttctgtgact ggtgagttact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 3120
 ttgctcttgc cccgcgtcaa tacggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 3180
 gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgtttag 3240
 atccagttcg atgtaaaccctt ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 3300
 cagcgttctt gggtagccaa aaacaggaag gcaaaatgccc gcaaaaaagg gaataaggc 3360
 gacacggaaa tggtgaataac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480
 ggttccgcg acatttcccc gaaaagtgc acctgacgtc taagaaaacca ttatttatcat 3540
 gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggccctt cgtctcgccg gtttcgggtga 3600
 tgacgggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtcgttaagc 3660
 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 3720
 ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tttactgaga gtgcaccata tgccgtgtga 3780
 aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcattcagg cgccattcgc cattcaggt 3840
 gcgcaactgt tgggaaggcc gatcggtgcg ggcctttcg ctattacgccc agctggcgaa 3900
 agggggatgt gctgcaaggc gattaagttt ggttaacgcca gggttttccc agtcacgc 3960
 ttgtaaaacg acggccagtg aattcggcgc gccgagctcc tcgagcaat ttacacattt 4020
 ccactaaacg tctaaaccct ttttttttctt ttttttttca ttttttttca ttttttttca 4080
 atttgcata aatttttata ttttttttca aattttataac accttttattt ttttttttca 4140
 ccaacactta gcaatttgc aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca 4200
 acatatacta atcaacttggaa aatgttttata ttttttttca aatttttttca aatttttttca 4260
 aagttagtga atatggtacc acaagggtttt gatgttttca ttttttttca ttttttttca 4320
 ggcataataca cccaaacattt aataattttt gatgttttca aatttttttca ttttttttca 4380
 aggtgcata acgtcacgtt gatgttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca 4440
 acacacaagt ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca 4500
 aatgttttca atggaaaggcc ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 4560
 aagaaaaactttaa cccaaacattt aataattttt gatgttttca ttttttttca ttttttttca 4620
 gcaataactttt ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca 4680
 cggccacccgc ggtggggccgc cgcctgtcgtt cttagaaggcc ttttttttca ttttttttca 4740
 cggccacccgc atgatcgcat gatatttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca 4800
 ctggacatgtt gtagctcaga ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca 4860
 cccgttactt ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca 4920
 agcaaaatttta cacatttgc aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca 4980
 ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 5040
 ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 5100
 ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 5160
 ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 5220
 ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 5280
 ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 5340
 ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 5400
 ttttttttca aatttttttca ttttttttca aatttttttca ttttttttca ttttttttca 5410

<210> 64

<211> 12093

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 64

gatctggcgc	cggccagcga	gacgagcaag	attggccgca	gcccggaaacg	atccgacagc	60
gcccggca	caggtgcgc	ggcaaattgc	accaacgc	acagcgccag	cagaatgcca	120
tagtggcgg	tgacgtcg	cgagtgaacc	agatcg	ggaggcccgg	cagcaccggc	180
ataatcaggc	cgatggcgc	agcgtcg	gacgacatgc	tcagaattac	gatcaggggt	240
atgtgggtt	tcacgtctgg	cctccggacc	agcctccg	gttccgattg	aacgcgcgga	300
ttctttatca	ctgataagtt	ggtggacata	ttatgtttat	cagtataaa	gtgtcaagca	360
tgacaaagtt	gcagccgaat	acagtgtacc	gtgcccgcct	ggacactgtt	aacgaggctg	420
gcgtagacgg	tctgacgaca	cgaaaactgg	cggaacggtt	gggggttcag	cagccggcgc	480
tttactggca	cttcaggaac	aagcgggcgc	tgctcgacgc	actggccgaa	gccatgctgg	540
cgaggaaatca	tacgcattcg	gtgcccggag	ccgacacga	ctggcgc	tttctgtatcg	600
ggaatgccc	cagttcagg	caggcgctgc	tcgcctacc	cgatggcgc	cgcacatccatg	660
ccggcacg	accgggcgc	ccgcagatgg	aaacggcga	cgcgcagtt	cgcttcctct	720
gcgaggcggg	ttttcggcc	ggggacgccc	tcaatgcgc	gatgacaatc	agctacttca	780
ctgttgggc	cgtgcttgag	gagcaggccg	gcgcacagc	tgccggcgc	cgcggcggca	840
ccgttgaaca	ggctccgc	tcgcccgt	tgccggccgc	gatagacgc	ttcgacgaag	900
ccggtccgg	cgcagcgtc	gagcaggac	tcgcgggt	tgtcgatgg	ttggcggaaaa	960
ggaggctcg	tgtcaggaac	gttgaaggac	cgagaaagg	tgacgattg	tcaggaccgc	1020
tgccggagcg	caacccactc	actacagcag	agccatgt	acaacatccc	ctccccctt	1080
ccaccgcgtc	agacgcccgt	agcagccgc	tacgggctt	ttcatgc	gccttagcgt	1140
ccaagcctca	cggccgcgt	cggcctct	ggcggcctt	tggcgctt	ccgcttcctc	1200
gctca	tgcgtcg	cggcgtt	gctgcggc	gcgttatc	ctcactcaaa	1260
ggcggtaata	cggttatca	cagaatcagg	ggataacgc	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	1320
aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgtt	ctggcg	tccataggct	1380
ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctca	cagagg	gaaacccgac	1440
aggactataa	agataccagg	cgttcccc	tggaagctt	ctcg	ctccgttcc	1500
gaccctgc	cttaccggat	acgttccgc	cttctcc	tcg	ggcgcttt	1560
ccgctgcata	accctgc	ggggcatt	tagcattt	ttcg	tatccat	1620
tcgcacgata	tacaggatt	tgccaaagg	ttcgtt	aga	cttccctt	1680
ggcgtcagcc	gggcaggata	ggtgaagtag	gcccaccc	gagcgggt	tccttctca	1740
ctgtccctt	tgcgcac	cggtgctc	acgggat	tgct	tcg	ggctggcgg
ctaccgcgg	cgtacacat	gaggcaag	ggatggct	tgaa	acc	1800
agggcagccc	acctatca	gtgtactg	ttcc	agac	gagac	1860
aggcggcggc	ggccggat	agcctgt	cctac	ctgt	ttcc	1920
aaatcacgg	cgtcg	ttatgac	tccgc	ggcc	tcg	1980
tggccgc	ggggccct	ctgaaact	ggctc	acc	gc	2040
tcggtgatgc	cacgatc	ccc	tg	ca	ggc	2100
gcaaggtcat	gatggcgt	gtccccc	ggc	ag	gg	2160
aacggccgg	gggtgcgt	gattgcca	cac	gt	cc	2220
gacttcgc	agctgg	gtacatc	acc	gac	gc	2280
gacgctcacc	gggctgg	ccctcg	gg	ct	tt	2340
cgccgcagaa	acgcgtc	agccgt	gag	cc	tc	2400
cctcgccgaa	aacttgg	tcactg	atg	cc	tt	2460
cgactcacc	ggcgcgg	tgacagat	ggggcagg	cgat	ttcg	2520
gagctggcca	gcctcg	tcgg	ggct	cc	gg	2580
gatgtggaca	agcctgg	taagtgc	g	cc	tt	2640
tgacagatga	ggggcgc	ccttg	gat	tt	cc	2700
gcacattt	acattt	ggtgt	gg	tt	cc	2760
ccgcccgtt	tgcggcc	gctaacc	ttt	aa	tt	2820
aaaccttgtt	ttaaccagg	gctgcgc	gt	ttt	aa	2880
tgccccccct	tctcgaa	acc	c	ttt	aa	2940
		cccgcc	c	ttt	aa	3000

tgcgccctc	ggccgcgaac	ggcctcaccc	caaaaatggc	agcgctggca	gtccttgc	3060
ttgcgggat	cggggcagta	acgggatggg	cgatcagcc	gagcgcgacg	ccggaaagca	3120
ttgacgtgcc	gcaggtgctg	gcatcgacat	tcagcgacca	ggtgcgggc	agtgagggcg	3180
gcggcctggg	tggcggctg	cccttcactt	cggccgtcg	ggcattcacg	gacttcatgg	3240
cggggccggc	aattttacc	ttggcattc	ttggcatagt	ggtcggggt	gccgtgc	3300
tgttcggggg	tgcataaac	ccagcgaacc	atttgaggtg	ataggtaaga	ttataccogag	3360
gtatgaaaac	gagaattgga	ccttacaga	attactctat	gaagcgccat	atttaaaaag	3420
ctaccaagac	gaagaggatg	aagaggatg	ggaggcagat	tgccttgaat	atattgacaa	3480
tactgataag	ataatataatc	ttttatata	aagatatcgc	cgtatgtaa	gatttcaggg	3540
ggcaaggcat	aggcagcgcg	cttataata	tatctataga	atgggcaag	cataaaaaact	3600
tgcatggact	aatgcttga	accaggaca	ataaccttat	agcttgtaaa	ttctatcata	3660
attgggtaat	gactccaact	tattgatgt	gttttatgtt	cagataatgc	ccgatgactt	3720
tgtcatgcag	ctccaccgat	tttgagaacg	acagcga	ccgtccc	cgtgc	3780
gctgcctcag	attcagg	ttgcgc	ttcgctcg	atatcg	ctgattacgt	3840
gcagcttcc	cttcaggcgg	gattcataca	gcggccagcc	atccgtc	cataccacca	3900
cgtcaaagg	tgacagcagg	ctcataagac	gcccc	cagcgt	cgccatagtg	3960
atacgtgc	aacaaccgtc	ttccggagac	tgcatacgc	gtaaaac	cagcgtc	4020
gcgat	cccgacatag	ccccactgtt	cgtccattt	cgcgc	atgacgtc	4080
tgcccgctg	tatgcgcg	gttaccgact	gcccgc	ttagtta	gacgtaaaat	4140
cgtgtt	ccaacgc	taatgcggc	ttgtgc	ccatca	catggc	4200
catatcaat	at	tttgcgg	ttgaga	gtgt	actgc	4260
ccatgttta	cg	gacat	gtgc	ccggc	tttgc	4320
acgcaccacc	ccgtc	ctgac	gggac	atag	acacag	4380
agcac	aaacaccatc	atacactaa	tca	ggc	cccataatt	4440
tggtttcaaa	atcgg	tcgata	tttac	actt	acaactt	4500
aaaagctgtt	ttctgtt	taagttt	aatg	caagg	aacat	4560
cttgttataa	ttagt	gggtat	taaaat	actgt	ttggat	4620
taaatggc	taatg	gaaat	atcacc	tttgc	ataccgc	4680
gtaaaagata	cg	gagga	gtct	cttgc	at	4740
aacctatatt	taaaaat	gac	ccgc	ccac	tgtgg	4800
gaaaaggaca	tgat	gctat	gct	cc	ac	4860
gaacggcat	atgg	ctgg	caat	cc	actt	4920
gaagagat	tgat	gac	atg	cc	tc	4980
aggctttc	actcc	catat	tg	cg	atc	5040
ttagcc	aat	tgg	tcc	ca	actt	5100
gaagaagaca	ctcc	attt	aa	at	tttgc	5160
cccgaagagg	aact	tttgc	tttgc	gac	ggaa	5220
gatggcaa	taag	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	5280
gacattgc	tct	gcgt	gtc	gtc	gt	5340
ctat	tttgc	gtc	gat	gat	gt	5400
ctggat	gat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	5460
caccgactt	ttcc	gc	at	cc	cc	5520
ggcaagggg	tcg	cttgc	tttgc	tttgc	tttgc	5580
cggcc	at	tc	cc	cc	cc	5640
ggcaccaggc	gggt	actt	cc	cc	cc	5700
cccgaagga	gggt	cc	cc	cc	cc	5760
cgacgc	tttcc	cc	cc	cc	cc	5820
gcccgc	ac	cc	cc	cc	cc	5880
g	cttcc	cc	cc	cc	cc	5940
ttcgc	ctc	cc	cc	cc	cc	6000
aggaactat	acg	cc	cc	cc	cc	6060
cgaggc	cagg	cc	cc	cc	cc	6120
ttcctgtt	gat	cc	cc	cc	cc	6180
ccgctctg	ctg	cc	cc	cc	cc	6240

ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc	6300
cgacgatgac gaactgggt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcg	6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg	6420
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt	6480
cacgtccgac cgcgttgggc accttgaatc ggtgtcgctg ctgcaccgct tccgcgtcct	6540
ggaccgtggc aagaaaaacgt cccgttgcga ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct	6600
gtttgctggc gaccactaca cgaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcccac	6660
ggcccgacgg atgttcgact attcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga	6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcgattc caccgcgtg aagaagtggc gcgcgcgggt	6780
cggcgaagcc tgcaagagt tgcgaggcag cggcctgggt gaacacgcct gggtaatga	6840
tgacctgggt cattgcaaac gctagggcct tttgggtca gttccggctg ggggttcagc	6900
agccagcgct ttactggcat ttcaagaaaca agcgggact gctgcacgc cttgcgttcgc	6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgtc tacgaactgc cgataaaacag aggattaaaa	7020
ttgacaattt tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgcgt gcaggattc	7080
cgcgagatcc gattgtcgcc cctgaagaaa gctccagaga ttgcgttgc cgtttacag	7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcatc	7200
ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggtct tcaaacagga ggacggcccc	7260
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gtttcgtgg agccgcgaa ggcaggccga	7320
ggggtcgccc gtatgctgct gcgggcgtt ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcg	7380
cgacagattc caacgggaaat ctgggtggatc cgcattttca tcctcgccgc acttaatatt	7440
tcgctatttct ggagcttgc ttattttcg gtctaccgc tgccggccgg ggtcgcggcg	7500
acggtaggcg ctgtgcggcc gctgatggc gtgttcatct ctgcgcgtct gctaggtagc	7560
ccgatacgtat tgatggcggt cctggggctt atttgcggaa ctgcggcggt ggcgctttg	7620
gtgttgcacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggcct ggcggggcg	7680
gtttccatgg cggtcgaaac cgtgtcgacc cgcaagtggc aaccccccgt gcctctgtc	7740
acctttaccg cctggcaact ggccgcggaa ggacttctgc tcgttccagt agtttagtg	7800
tttgcattccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcg	7860
ctgatcgag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgact ctcgaacct	7920
acagttgttt ctttactggg ctttctcage cccagatctg ggtcgtatca gccggggatg	7980
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgcacgttgc ccattcggtg agcaatggat	8040
aggggagttg atatcgtaa cgttcacttc taaagaaata gcgcactca gcttcctcag	8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatacgatc tcaagatcg cagcctgtca	8160
cggtaagcg agaaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata	8220
tttgcattaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgttacc ctccgcgaga	8280
tcatccgtgt ttcaaaacccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat	8340
gagcaaaatgc tgccgccta caacggctct cccgctgacg ccgtccggga ctgatggct	8400
gcctgtatcg agtgggtatt ttgtccgag ctgcgggtcg gggagctgtt ggctggctgg	8460
tggcaggata tattgtgggt taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg	8520
gacggtttta atgtactggg gtgggttttc ttttccaccag tgagacgggc aacagctgt	8580
tgcccttcac cgcctggccc tgagagatgt gcagcaagcg gtccacgtcg gtttgc	8640
gcaggcgaaa atcctgtttt atgggtggtc cgaatcggtc aaaatccctt ataaatcaaa	8700
agaatagccc gagatagggt tgagtgttgc tccagtttttgg aacaagagtc cactattaaa	8760
gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg	8820
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgagggtgc cgtaaagcac taaatcgaa	8880
ccctaaaggg agcccccgat tttagagcttgc acggggaaag ccggcgaaacg tggcgagaaa	8940
ggaagggaaag aaagcgaaaag gagcgccgc cattcaggatc gcgcactgt tgggaagggc	9000
gatcggtgcg ggccttttcg ctattacgtcc agtggcgaa agggggatgt gctgcagac	9060
gattaagttt ggttaacgcgca gggttttccc agtcacgcg ttgtaaaacgc acggccagtg	9120
aattaattcc catcttgcata gaaatataatgt taaaatattt attgataaaaa taacaagtca	9180
ggttattatag tccaagcaaa aacataaaatt tattgtatgc agttaaatt cagaaatatt	9240
tcaataactg attatatcgat ctggtagatc gccgttagatc aaagactgag tgctgatatta	9300
tgtgtatatac ataaattgtat gatatacgta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaaagct	9360
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgta agaaggcgat agaaggcgat ggcgtcgaa	9420
tcgggagcgg cgataccgtt aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaagctct	9480

tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgcccac acccagccgg	9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca	9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc ggcgcctttag cctggcgaac	9660
agttccggctg ggcgcagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg	9720
gcttcatcc gagaatgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgtgtgc gaatggcag	9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgcgc attgcatacg ccatacgatggta tactttctcg	9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgcccccggca cttcgcccaa tagcagccag	9900
tccctcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgccc cgtcgtggcc	9960
agccacgata gcccgcgtgc ctcgtcctgc agttcattca gggcaccggc caggtcggtc	10020
ttgacaaaaaa gaaccggggcg cccctgcgtc gacagccggc acacggccgc atcagagcag	10080
ccgattgtct gttgtgcca gtcatacgcc aatagcctct ccacccaagc ggccggagaa	10140
cctgcgtgca atccatcttgc ttcaatccaa gctccatgg gcccgcact agagtcgaga	10200
tctggattga gagaatgatgat gagactctaa ttggataccg agggaaattt atggaacggtc	10260
agtggagcat ttttgcataag aaataatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga	10320
acgcgcaata atggttctg acgtatgtgc tttagcttcaaaactccaga aacccgcggc	10380
tgagttggctc cttcaacgtt gcggtctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc	10440
gtcatggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcatacgat ttgatccct	10500
gcccgcgtc atccctggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac	10560
cttaccagag ggcgcggccag ctggcaattc cgggtcgctt gctgtccata aaaccgcggc	10620
gtctagctat cgccatgtaa gcccactgca agctacccgtc tttctctttg cgcttcgtt	10680
ttcccttgc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctcg	10740
actggcttc tacgtgttcc gttccctta gcagcccttgc cgcctgatg gcttgcggca	10800
gctgtgaagct tgcatgcgtc caggtcgacg ggcgcggcag ctactcgagc aaatttacac	10860
attgcaccaaa aacgtctaaa cccttgcataat ttgtttttgt ttactatgt gtgttatgt	10920
tttgatttgc gataaaatttt tatattttgtt actaaattta taacacccctt tatgctaacg	10980
tttgccaaca ctttagcaatt tgcaagttga ttaatttgatt ctaaatttatt ttgtcttct	11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgtaa aatatttgc aatatttcta ctataggaga	11100
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg ttggagatt taatttgc aatgctgc	11160
ggatggcata tacaccaaaat attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga	11220
tttgagggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta attttcaag acaacaatgt	11280
taccacacac aagtttttagag gtgcgtgc ggtgcgcctg tggaaatgtt aaaaatattt	11340
tggaaatgtat ttgcgtggaa gccatgtgtaa aaccatgac atccacttgg aggtgcaat	11400
aatgaagaaa actacaaaatt tacatgcac tagttatgca tttgtctat ataatgagga	11460
ttttgcaata ctttcatca tacacactca ctaagttta caccattata atttcttcat	11520
agccagccca cgcgggtggg cggccgcctg cagttctgaa ggcgccttgc ttaatgaga	11580
tatgcgagac ggcctatgatc gcatgatatt tgctttcaat tctgtgtgc acgttgcata	11640
aaacctgagc atgtgttagct cagatcccttgc cgcgcggcgtt cgggtcattc taatgaaat	11700
atcacccgtt actatcgat ttatgaaat aatatttctcc gttcaattta ctgattgtcc	11760
gtcgacgaat tcgagctcggtt cgcgcctcta gaggatcgat gaattcagat cggctgatgt	11820
gctccttcaa cttgtgtgtt ctgtcaatggc cttttttttttt cttttttttttt	11880
ggcgggggttc ataacgtgac tcccttaattt ctccgtcat gatcagattt tgggtttcccg	11940
ccttcagttt aaactatcgat ttgtttttttt gatattttgg cgggtaaacc taagagaaaa	12000
gagcgtttat tagaataatc ggtatattaa aagggtgtga aaagggtttat ctttcgtcca	12060
tttgcgtatgtt catgccaacc acagggttcc cca	12093

<210> 65

<211> 12085

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<221> misc_feature

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer Promotor-Terminator-Expr

essionskassette

<400> 65

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccggaaacg atccgacagc	60
gcgcccagca caggtgcgca ggcaattgc accaacgcac acagcgccag cagaatgcca	120
tagtggccgg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgccga ggaggcccgg cagcacccgc	180
ataatcaggc cgatgcccac agcgtcgacg ggcacagtgc tcagaattac gatcaggggt	240
atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgtt ggtccgattt aacgcgcggaa	300
ttctttatca ctgataagggt ggtggacata ttatgtttt cagtgataaa gtgtcaagca	360
tgacaaaagtt gcagccgaat acagtgtatcc gtgcccgcctt ggacctgttg aacgaggctg	420
gcgttagacgg tctgacgaca cgccaaactgg cggAACGGTT gggggttcag cagccggcgc	480
tttactggca cttcaggaaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg	540
cggagaatca tacgcattcg gtgcccggag ccgacgacga ctggcgctca tttctgtatcg	600
ggaatgcccgg cagttcagg caggcgctgc tcgccttaccg cgatggcgccg cgcattcatg	660
ccggcacgcg accggggcgcg ccgcagatgg aaacggccga cgccagctt cgcttccct	720
gcgaggcggg ttttcggcc ggggacggc tcaatgcgtt gatgacaatc agtacttca	780
ctgttggggc cgtgtttttag gggcaggccg ggcacagcga tgccggcgag cgccggcggca	840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgcctgtt tgccggccgc gatagacgac ttgcacgaag	900
ccgggtccggc cgcagcggtt gggcaggac tcgcgtttagt tgctcgatggaa ttggcgaaaa	960
ggaggcgttgcgt tgctcaggaaac gttgaaggac cgagaaaagggt tgacgatttga tcaggaccgc	1020
tgccggagcg caacccactc actacagcag agccatgtt acaacatccc ctccccctt	1080
ccaccgcgtc agacgcccgtt agcagccgc tacggcttt ttcatgccc gccctagcgt	1140
ccaaaggctca cggccgcgtt cggccctctt ggcggccctt tggcgcttcc cgccttcc	1200
gctcaactgac tcgctcggtt cggcgttccg gctgcggcga ggggtatcag ctcactcaaa	1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgcga gggaaaca ttttgcgttcaaa	1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaaa ggccgcgtt ctggcgccccccctt tccataggct	1380
ccgccccccctt gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgcac	1440
aggactataa agataccagg cgtttcccccc tggaaagctcc ctgcgtcgctt ctcctgttcc	1500
gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt	1560
ccgctgcata accctgttcc ggggtcatta tagcgatttt ttcggatataatccatccctt	1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaagggt ttcgtgttgc ctttcttgg tttatccaa	1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtagt gcccacccgc gagcgggtgt tcccttca	1740
ctgtccctta ttgcacccgtt gcgggtgttca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg	1800
ctaccggcccg cgtaacagat gggcaagc ggtatggcttga tgaaaccaag ccaaccagga	1860
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa	1920
aggcggccggc ggccggcatg agcctgtcggtt cctacctgtt ggccgtcgcc cagggctaca	1980
aaatcacggg cgtcggttgc tatgacgcacg tccgcgttgc gggccgcatttccatccatc aatggcgacc	2040
tggccgcctt gggcggcctt ctgaaacttgc ggctcaccgc gacccgcgc acggcgccgt	2100
tcgggtatgc caccatccctt gccctgttgc cgaagatcga agagaagcag gacgagcttgc	2160
gcaagggtcat gatggggcgtt gtcggccgc gggcagagcc atgactttt tagccgttcaaa	2220
aacggccggg ggggtgcgcgtt gattggcaag cacgtccccca tggcgccat caagaagagc	2280
gacttcgcgg agctgggttga gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga ggcgccttgc	2340
gacgctcacc gggctgggtt ccctcgccgc tggctggcg ggcgtctatg gccctgc	2400
cgccgcggaa acgcgcgtca agccgtgtgc gagacacccgc ggccgcggc gttgtggata	2460
cctcgccggaa aacttggccc tcactgttgc atgagggccg gacgttgcata cttgaggggc	2520
cgactcacc ggcgcggcgt tgacagatga gggcaggtt cgatttcggc cggcgacgtt	2580
gagctggcca gcctcgccaa tcggcaaaaa cgcctgttca ctttgcgtt tccacagat	2640
gatgtggaca agcctggggta aatgtgcctt ggggtatttgc cacttgcgtt ggcgcactac	2700
tgacagatga gggcgcgtt cttgcacact tgaggggcag agtgcgttca gatgaggggc	2760
gcacccatttgc acatggggcagg ggctgtccac aggcagaaaaa tccagcattt gcaagggttt	2820
ccggccgtttt ttgcggccacc gctaaccgtt ctttgcgtt gctttaaac caatatttt	2880
aaaccccttgc tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgttca cggcgacgc cgaagggggg	2940
tgcccccctt ttcgcaccc tccggccccc ctaacgcggg cttccatcc cccaggggc	3000

90

tgcccccctc	ggccgcgaac	ggcctcaccc	aaaaatggc	agcgctggca	gtccttgcca	3060
ttgcccggat	cggggcagta	acggatggg	cgatcagccc	gagcgcgacg	cccgaaagca	3120
ttgacgtgcc	gcaggtctg	gcatcgacat	tcagcgacca	ggtgccggc	agtgagggcg	3180
gccccctggg	tggccgcctg	cccttcaact	cgccgtcgg	ggcattcacg	gacttcatgg	3240
cggggccggc	aatttttacc	ttggcattc	ttggcatagt	ggtcgccgg	gcccgtctcg	3300
tgttcggggg	tgcgataaac	ccagcgaacc	atttggggt	ataggtaa	ttataccgg	3360
gtatgaaaac	gagaattgga	ccttacaga	attactctat	gaagcgccat	atttaaaaag	3420
ctaccaagac	gaagaggatg	aagaggatga	ggaggcagat	tgccttgaat	atattgacaa	3480
tactgataag	ataatatac	ttttatata	aagatatcgc	cgtatgtaa	gatttcaggg	3540
ggcaaggcat	aggcagcgcg	cttataata	tatctataga	atggcataag	cataaaaaact	3600
tgcatggact	aatgttggaa	accaggaca	ataacctt	agctgtaaa	ttctatcata	3660
attgggtaat	gactccaact	tattgatgt	tttttatgtt	cagataatgc	ccgatgactt	3720
tgtcatgcag	ctccaccat	tttgagaacg	acagcgaactt	ccgtcccgac	cgtgccagg	3780
gctgcctcag	attcaggta	tgccgctcaa	ttcgctcggt	atatcgctt	ctgattacgt	3840
gcagcttcc	tttcaggcgg	gattcataca	gcggccagcc	atccgtcata	catatcacca	3900
cgtcaaggg	tgacagcagg	ctcataagac	gccccagcgt	cgccatagtg	cgttcacca	3960
atacgtgcgc	aacaaccgtc	ttccggagac	tgtcatacgc	gtaaaacacgc	cagcgcgtggc	4020
gcgatttagc	cccgacata	ccccactgtt	cgtccatttc	cgccgagacg	atgacgtcac	4080
tgcccgctg	tatgcgcgag	gttaccgact	gcggccttag	tttttaagt	gacgtaaaat	4140
cgtgttgggg	ccaacgccc	taatgcgggc	ttttggccgg	catccaacgc	cattcatggc	4200
catatcaatg	attttctgg	gcgttccggg	ttgagaagcg	gtgttaatgt	actgcagg	4260
ccatgtttt	ccgcagttag	agcagagata	gcccgtatgt	ccggcggtgc	ttttccgtt	4320
acgcaccacc	ccgtcagtag	ctgaacagga	gggacagcgt	atagacacag	aagccactgg	4380
agcacctcaa	aaacaccatc	atacactaa	tcaagtgg	ggcagcatca	cccataattt	4440
tggttcaaa	atcggtccg	tcgatactat	gttatacggc	aacttggaa	acaactttga	4500
aaaagctgtt	ttctggatt	taaggttta	gaatgcacgg	aacagtgaat	tggagttcgt	4560
cttgttataa	ttagcttctt	ggggtatctt	taaatactgt	agaaaagagg	aaggaaataa	4620
taaatggcta	aaatgagaat	atcacggaa	ttgaaaaaaac	tgatcgaaaa	ataccgtgc	4680
gtaaaagata	cggaaaggaa	gtctcctgct	aaggatata	agctgggg	agaaaatgaa	4740
aacctatatt	taaaaatgac	ggacagccgg	tataaaggga	ccacccatga	tgtggacacgg	4800
gaaaaggaca	tgatgtatg	gctggaaagga	aagctgcctg	ttccaaaggt	cctgcactt	4860
gaacggcatg	atggctggag	caatctgctc	atgagtggagg	ccgatggcgt	cctttgctcg	4920
gaagagtagt	aagatgaaca	aagccctgaa	agattatcgt	agctgtatgc	ggagtgcac	4980
aggcttttc	actccatcga	catatcggt	ttccctata	cgaatagctt	agacagccgc	5040
ttagccgaat	tggattactt	actgaataac	gatctggccg	atgtggattt	cgaaaactgg	5100
gaagaagaca	ctccattaa	agatccgcgc	gagctgtatg	atttttaaa	gacggaaaag	5160
cccgaaagg	aacttgcctt	ttcccacggc	gacctggggag	acagcaacat	ctttgtggaa	5220
gatggccaaag	taagtggctt	tattgatctt	gggagaagcg	gcagggcgga	caagtggat	5280
gacattgcct	tctgcgtccg	gtcgatcagg	gaggatatcg	gggaagaaca	gtatgtcgag	5340
ctatttttg	acttactgg	gatcaaggct	gattggggaa	aaataaaaata	ttatatttt	5400
ctggatgaat	tgttttagta	cctagatgt	gcccgtatgt	gtggattatc	tggacaccaa	5460
caccgacttc	ttccgcata	agtgtttgg	ctctcaggcc	gaggcccacg	gcaagtattt	5520
gggcaagggg	tgcgtggat	tcgtgcagg	caagattcgg	aataccaa	acgagaagga	5580
cggccagacg	gtctacggg	ccgacttcat	tgccgataag	gtggattatc	tggacaccaa	5640
ggcaccaggc	gggtcaat	aggaataagg	gcacattgccc	ccggcgtgag	tcggggcaat	5700
cccgcaagga	gggtgaatga	atcgacgtt	tgaccggaa	gcatacaggc	aagaactgt	5760
cgacgcgggg	tttccggccg	aggatgcga	aaccatcgca	agccgcaccc	tcatgcgtc	5820
gccccgcgaa	acccatccgt	ccgtcgctc	gatgggtccag	caagctacgg	ccaagatoga	5880
cgcgacacgc	gtgcaactgg	ctccccctgc	cctgcccgcg	ccatcgcccg	ccgtggagcg	5940
ttcgcgtcgt	ctcgaacacgg	aggcggcagg	tttggcgaag	tcgatgacca	tcgacacgcg	6000
aggaactatg	acgaccaaga	agcggaaaac	cgccggcgag	gacctggcaa	aacaggtcag	6060
cgaggccaag	caggccgcgt	tgctgaaaca	cacgaagcag	cagatcaagg	aatgcacgt	6120
ttccctgttc	gatattgcgc	cgtggccgga	cacgatgcga	gcgatgcca	acgacacgcg	6180
ccgctctgcc	ctgttccacca	cgcgcaacaa	gaaaatcccg	cgcgaggcgc	tgcaaaaacaa	6240

ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctcg agctgcgggc	6300
cgacgatgac gaactgggt ggcagcaggt gttggagtagc gcgaagcgca cccctatcg	6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggc cgatcaatgg	6420
ccggattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt	6480
cacgtccgac cgcgttggc accttggatc ggtgtcgctg ctgcaccgct tccgcgtcct	6540
ggaccgtggc aagaaaaacgt cccgttgcga ggtcctgatc gacgaggaaa tgcgtcgct	6600
gtttgctggc gaccactaca cgaattcat atgggagaag taccgcaagc tgcgcgcac	6660
ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccggag ccgtaccgc tcaagctgga	6720
aacctccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt	6780
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggc gaacacgcct gggtaatga	6840
tgacctggc cattgcaaaac gctagggcct tgcgtgggtca gttccggctg ggggttcagc	6900
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcaact gtcgcacgc cttgcgtcgc	6960
tcagtatgcg tcgggacgca cggcgcgtc tacgaactgc cgataaaacag aggattaaaa	7020
ttgacaattt tgattaaaggc tcaagattcg cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc	7080
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaaa gctccagaga tgcgtggc tgcgttacgag	7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcggtc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc	7200
ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc	7260
aaggacgctc acaaggcga tctgtccggc gtttctggc agcccaaca gcgaggccga	7320
ggggtcgccc gtatgctgt gcggcggtt cggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc	7380
cgacagattc caacggaaat ctgggtggatc cgcatttc tccgcgcgc acttaatatt	7440
tcgctattt ggagcttgc gtttatttcg gtctaccggc tgccggcgg ggtcgcggcg	7500
acggtaggcg ctgtcagcc gctgatggc gtgttcatct ctgcgcctc gctaggttagc	7560
ccgatacgt tgcgtggcgtt cctggggctt atttgcggaa ctgcggcgtt ggccgtgttgc	7620
gtgttgcacaa caacgcgc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggcgg	7680
gtttccatgg cggtcgaaac cgtgcgtacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgc	7740
acctttaccg cctggcaact ggccggccga ggacttctgc tgcgttccagt agcttttagt	7800
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tgcgcgttgc gtggctcggc	7860
ctgatcgagg cgggtttaac ctactcctt tgggtccggg ggatctcgactc actcgaaact	7920
acagttgttt ctttactggg ctttctcagc cccagatctg gggtcgatca gccggggatg	7980
catcaggccg acagtcggaa ctgcgggtcc cccacgttgc ccattcggc agcaatggat	8040
agggggatgg atatcgtaa cgttcaactc taaaagaaata ggcgcactca gttccctcag	8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca	8160
cggtaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata	8220
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcata gttacaatca acatgttacc ctccgcgaga	8280
tcatccgtt tccaaacccg gcaagcttgc tgcgttctt ccgaatagca tgcgttacat	8340
gagcaaagtc tgcgcctta caacggctct cccgctgacg cgcgtccggc ctgatgggt	8400
gcctgtatcg agtgggtatt ttgtggcag ctgcggctcg gggagctgtt ggctggctgg	8460
tggcaggata tattgtgggt taaaacaaat gacgcttaga caactaata acacattgcg	8520
gacgtttta atgtactggg gtgggttttc ttttccaccag tgagacggc aacagctgat	8580
tgccttcac ccgcgtggcc tcgagagatgt gacgcaagcg gtccacgcgt gtttgc	8640
gcaggcgaaa atccctgtttt atgggtggc cggaaatcgcc aaaatccctt ataaatcaa	8700
agaatacgccc gagatagggt tgagtgttgc tccagttttgg aacaagagtc cactattaa	8760
gaacgtggac tccaaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg	8820
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgagggtgc cgtaaagcac taaatcgaa	8880
ccctaaaggg agcccccgat tttagagcttgc acggggaaag cccgcgaacg tggcgagaaa	8940
ggaagggaaag aaagcgaaag gagcgccgc cattcaggct ggcgaactgt tgggaaggc	9000
gatcggtgcg ggcccttcg ctattacgc agtggcgaa agggggatgt gtcgcaaggc	9060
gattaagttt ggttaacgc ggggtttccc agtcacgc acgttgcgttgc tgcgttac	9120
aattaattcc catcttgc gaaatataatgt taaaatattt attgataaaaa taacaagtca	9180
ggtattatag tccaaagcaaa aacataaaatt tattgtatgc agttaatattt cagaaatatt	9240
tcaataactg attatatcgat ctggatcatt gccgtatgcgaa aagactgtag tgcgtatatt	9300
tgtgtatatac ataaattgtat gatatacgat gttaaaacgc acggccagtg	9360
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgatc agaaggcgat agaaggcgat ggcgtgcgaa	9420
tcgggagcgg cgataccgtt aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaagctct	9480

tcagcaatat cacgggttagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg	9540
ccacagtgcg tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca ttagtattcgg caagcaggca	9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcattgc ggcctttag cctggcgAAC	9660
agttcggctg ggcgcggccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg	9720
gcttccatcc gagaatgtgc tcgctcgatc cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag	9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgccc attgcattcag ccatgatgga tacttttcg	9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgcccccggca ctgcggccaa tagcagccag	9900
tccctcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgccc cggtcggtggcc	9960
agccacgata gcccggctgc ctcgtcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	10020
ttgacaaaaaa gaaccggggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcgcc atcagagcag	10080
ccgattgtct gttgtgccc gtcatacgccg aatagcctct ccacccaagg ggccggagaa	10140
cctgcgtgca atccatctg ttcaatccaa gctccatgg gcccctcgact agagtcgaga	10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggAACgtc	10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttg	10320
acgcgcataa atgggttctg acgtatgtgc tttagctatt aaactccaga aacccgggc	10380
tgagttggctc cttcaacgtt gcccggctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccg	10440
gtcatcgccg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatccct	10500
gcgcacatcg atccctggcg gcaagaaagg catccagttt acttgcagg gcttcccaac	10560
cttaccagag ggccggcccg ctggcaattc cgggtcgctt gctgtccata aaaccgcaca	10620
gtctagctat cggccatgtaa gcccactgca agctacgtc tttctctttg cgcttcgtt	10680
ttcccttgc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgg	10740
actggcttc tacgtgttcc gcttcctta gcagcccttg cgcctcgat gcttgcggca	10800
gcgtgaagct tgcatgcctg cagggtcgacg gcgcggccgag ctccctcgagc aaatttacac	10860
attgcacta aacgtctaaa cccttgcata ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgt	10920
tttgatttgc gataaatttt tatattttgtt actaaattta taacaccttt tatgctaacg	10980
tttgccaaaca ctttagcaatt tgcaagttga ttaatttgatt ctaaatttatt tttgtcttct	11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgtaa aatatttgc aatatttcta ctataggaga	11100
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg ttggagatt taattgtgc aatgctgcat	11160
ggatggcata tacaccaaaacttcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga	11220
tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt	11280
taccacacac aagtttttagt gtgcgtatgc ggtatgcctg tggaaagttt aaaaatattt	11340
tggaaatgtat ttgcgtggaa gccatgtgtaa aaccatgac atccacttgg aggatgcaat	11400
aatgaagaaa actacaaatt tacatgcac tagttatgca tggatgtctat ataatgagga	11460
ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta caccgattata atttcttcat	11520
agccagcggta tccgatatacg ggcccgctag cgttaaccct gcttaatgtatgc gatatgcgag	11580
acgcctatga tcgcgtatgata ttgcgttca attctgttgc gacatgtgtaa aaaaacctga	11640
gcatgtgttag ctccagatccat taccggccgtt tccgggtcat tctaattgtat atatcaccgg	11700
ttactatcgat attttttatgtataatatttct cgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga	11760
attcgagctc ggccgcgcctc tagaggatcg atgaatttcg atcggctgag tggctcccttc	11820
aacgttgcgg ttctgtcagt tccaaacgtaa aacggcttg tcccgctca tcggcgggggg	11880
tcataacgtg actcccttaa ttctccgtc atgatcgat tggatgtttcc cgccttcgt	11940
ttaaaactatc agtgggttgcg aggatattt ggcgggtaaa cctaaagagaa aagagcggtt	12000
attagaataa tcggatattt aaaaggccgt gaaaagggtt atccttcgtc catttgcattatgt	12060
tgcatgcacca ccacagggtt cccca	12085

<210> 66

<211> 12079

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 66

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccggaaacg atccgacagc

60

gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcac acagcgccag cagaatgcc	120
tagtgggcgg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgccga ggaggcccgg cagcacccgc	180
ataaatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc ggcacagtgc tcagaattac gatcaggggt	240
atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattt aacgcgcgga	300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaa gtgtcaagca	360
tgacaaaagtt gcagccgaat acagtgtatcc gtgcgcctt ggacctgtt aacgaggctg	420
gcgttagacgg tctgacgaca cgcaaaactgg cggAACGGTT gggggttcag cagccggcgc	480
tttactggca cttcaggAAC aagccccgcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg	540
cgggagaatca tacgcattcg gtgcggagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg	600
ggaatgcggc cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg	660
ccggcacgcg accccccgcg cccgacatgg aaacggccga cgcgcagctt cgctccctct	720
gcgaggcggg ttttcggcc ggggacgccc tcaatgcgct gatgacaatc agctactca	780
ctgttggggc cgtgtttttag gggcaggccg ggcacagcga tgccggcgag cgccggcgca	840
ccgttgaaca ggctccgcgc tcgcgcgtt tgccggccgc gataacgcgc ttgcacgaag	900
ccgggtccggc cgcagcggtt gggcaggac tgccgggtat tgtcgatggaa ttggcgaaaa	960
ggaggcttgt tgtcaggAAC gttgaaggac ggagaaagggg tgacgattga tcaggacccgc	1020
tgccggagcg caacccactc actacagcag agccatgttag acaacatccc ctccccctt	1080
ccaccgcgtc agacgcccgt agcagccgc tacgggctt ttcatgcctt gcccctagcgt	1140
ccaaggctca cggccgcgtc cggccctctt ggcggccttc tggcgtctt ccgccttc	1200
gctcaactgac tcgctgcgtt cggcgttcc gctgcggcga ggcgtatcag ctcactcaaa	1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgcga ggaaagaaca ttttgagcaaa	1320
aggccagcaa aaggccaggacc accgtaaaaaa ggccgcgtt tgccgtttt tccataggt	1380
ccgccccccct gacgagcatc acaaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgc	1440
aggactataa agataccagg cttttccccc tggaaagctcc ctcgtcgct ctcctgttcc	1500
gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcggaaagcg tggcgctttt	1560
ccgctgcata accctgttcc ggggtcatta tagcgatttt ttcggatataat ccatccttt	1620
tcgcacgata tacaggatt tgccaaagggtt ttcgtgttgcgat ctttcccttgg tttatccaa	1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gcccacccgc gaggccgtgt tccttctca	1740
ctgtccctta ttgcaccttgc ggggtgcgtca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg	1800
ctaccgcggc cgtacacagat gaggcgaagc ggtggctga tgaaaccaag ccaaccagga	1860
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa	1920
aggcggccggc ggcggcgttgc agcctgtccg cctacctgtt ggcgtcgcc cagggttaca	1980
aaatcacggg cgtcgtggac tatgacgcacg tccgcgttgc ggcggcgttgc aatggcgacc	2040
tggccgcctt gggcggcctt ctgaaactctt ggcgttccat ctttcccttgg tttatccaa	2100
tcgggtatgc cacgttccgc cccctgtgg cgaagatcga agagaagcg gacgagcttgc	2160
gcaagggtcat gatgggcgtg gtccgcggc gggcaggagcc atgactttt tagccgttac	2220
aacggccggg ggggtgcgtt gatttccaaag cacgtccca tgcgtccat caagaagagc	2280
gacttcggcgg agctgggttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	2340
gacgttcacc gggctgggttgcgtt ccctcgccgc tggcgttccat ctttcccttgg tttatccaa	2400
cgcgcaggaa acggcgatcga agccgtgtcc gggcaggccgc ggcggccggc gttgtggata	2460
cctcgcggaa aacttggccc tcactgcacat atgaggggccg gacgttgcaca tttcccttgg tttatccaa	2520
cgactcaccc ggcggccgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	2580
gagctggccca ggcgttccat ctttcccttgg tttatccaa	2640
gatgtggaca acggcgatggc ttacgttccat ctttcccttgg tttatccaa	2700
tgacagatgc gggcggccgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	2760
gcacccatccat tttcccttgg tttatccaa	2820
ccggccgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	2880
aaacccatccat tttcccttgg tttatccaa	2940
tggccggccgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	3000
tgcgcggccgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	3060
ttggccggat cggggcgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	3120
ttgacgttgcgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	3180
cgccgcgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	3240
cgccgcgttgcgtt gttttccat ctttcccttgg tttatccaa	3300

tgttcgaaaa	tgcgataaac	ccagcgaacc	atttgagggt	ataggtaaga	ttataccgag	3360
gtatggaa	gagaattgga	cctttacaga	attactctat	gaagcgcatt	atttaaaaag	3420
ctaccaagac	gaagaggatg	aagaggatga	ggagggcagat	tgccttgaat	atattgacaa	3480
tactgataag	ataatatac	tttatatacg	aagatatcgc	cgtatgtaa	gatttcaggg	3540
ggcaaggcat	aggcagcgcg	cttataata	tatctataga	atgggcaaag	cataaaaact	3600
tgcatggact	aatgcttga	acccaggaca	ataaccttta	agcttgcata	ttctatcata	3660
attggtaat	gactccaact	tattgatgt	gttttatgtt	cagataatgc	ccgatgactt	3720
tgtcatgcag	ctccaccgat	tttgagaacg	acagcgcactt	ccgtccca	cgtgccaggt	3780
gctgcctcag	attcaggtt	tgccgctcaa	ttcgctgcgt	atatcgctt	ctgattacgt	3840
gcagctttcc	cttcaggccg	gattcataca	gcggccagcc	atccgtcata	cataatcacca	3900
cgtcaaagg	tgacagcagg	ctcataagac	gccccagcgt	cgccatagtg	cgttcacca	3960
atacgtgcgc	aacaaccgtc	ttccggagac	tgtcatacgc	gtaaaacacgc	cagcgcgttgc	4020
gcgattttagc	cccgacata	ccccactgtt	cgtccatttc	cgccgcac	atgacgtcac	4080
tgcccggctg	tatgcgcgag	gttaccgact	gcggcctgag	tttttaagt	gacgtaaaat	4140
cgtgttgggg	ccaacgcca	taatgcgggc	tggtccccgg	catccaacgc	cattcatggc	4200
catatcaatg	attttctgtt	gcgtaccggg	ttgagaagcg	gtgttaagtga	actgcagtt	4260
ccatgtttt	cggtcgtt	agcagagata	gcgcgtatgt	ccggcgggtgc	ttttggcgtt	4320
acgcaccacc	ccgtcgttag	ctgaacacagga	gggacagctg	atagacacag	aagccactgg	4380
agcacctcaa	aaacaccatc	atacactaaa	tcagtaagt	ggcagcatca	cccataattt	4440
tggtttcaaa	atcggctccg	tcgatactat	gttatacgcc	aactttgaaa	acaactttga	4500
aaaagctgtt	ttctggatt	taaggtttta	gaatgcagg	aacagtgaat	tggagttcgt	4560
cttggtaata	ttagcttctt	ggggtatctt	taaatactgt	agaaaagagg	aaggaaataa	4620
taaatggcta	aaatgagaat	atcaccggaa	ttgaaaaaac	tgatcgaaaa	ataccgtgc	4680
gtaaaaagata	cggaaggaaat	gtctcctgct	aaggatata	agctggtggg	agaaaatgaa	4740
aacctatatt	taaaaaatgac	ggacagccgg	tataaaggga	ccacctatga	tgtggAACGG	4800
gaaaaggaca	tgatgctatg	gctggaaagga	aagctgcctt	ttccaaaggt	cctgcacttt	4860
gaacggcatg	atggctggag	caatctgttc	atgagtgcgg	ccgatggcgt	ccttgctcg	4920
gaagagttat	aagatgaaca	aagccctgaa	aagattatcg	agctgtatgc	ggagtgcac	4980
aggcttttc	actccatcga	catatcggt	tgtccctata	cgaatagctt	agacagccgc	5040
ttagccgaat	tggattactt	actgaataac	gatctggccg	atgtggattt	cgaaaactgg	5100
gaagaagaca	ctccatttaa	agatccgcgc	gagctgtatg	attttttaaa	gacggaaaag	5160
cccgaaagg	aacttgcctt	ttcccaacggc	gacctggggag	acagcaacat	ctttgtgaaa	5220
gatggcaaa	taagtggctt	tattgatctt	gggagaagcg	gcaggcggaa	caagtggat	5280
gacatgcct	tctcgctccg	gtcgatcagg	gaggatatcg	gggaagaaca	gtatgtcgag	5340
ctatttttg	acttactggg	gatcaaggct	gattgggaga	aaataaaaata	ttatatttt	5400
ctggatgaat	tgtttttagt	cctagatgt	gcgcacat	gccggcgaca	agcaggagcg	5460
caccgacttc	ttccgcata	agtgtttgg	ctctcaggcc	gaggcccacg	gcaagtattt	5520
ggcgggggg	tcgtctggat	tcgtcagg	caagattcgg	aataccaaat	acgagaagga	5580
cgcccaagac	gtctacggg	ccgacttcat	tgccgataag	gtggattatc	tggacacccaa	5640
ggcaccaggc	gggtcaaaatc	aggaataagg	gcacattgcc	ccggcgtgag	tcggggcaat	5700
cccgcaagga	gggtgaatga	atcgacgtt	tgaccggaa	gcatacaggc	aagaactgt	5760
cgacgcgggg	tttccgcgg	aggatccga	aaccatcgca	agccgcac	tcatgcgtgc	5820
gccccgcgaa	accttccagt	ccgtcggctc	gatggccat	caagctacgg	ccaagatcga	5880
gcgcgcac	gtgcacatgg	ctccccctgc	cctgcccgcg	ccatcgccg	ccgtggagcg	5940
ttcgcgtcg	ctcgacacagg	aggcggcagg	tttggcgaag	tgcgtacca	tgcacacgcg	6000
aggaactatg	acgaccaaga	agcaaaaac	cgccggcgg	gacctggca	aacaggtcag	6060
cgaggccaag	caggccgcgt	tgctaaaaca	cacgaagcag	cagatcaagg	aatatgcacgt	6120
ttcctgttc	gatattgcgc	cgtggccgg	cacgtacgc	gcgtatgc	acgacacccgc	6180
ccgcctgc	ctgttccacca	cgcgacacaa	gaaaatccc	cgcgaggcgc	tgcaaaaacaa	6240
ggtcatttc	cacgtcaaca	aggacgtgaa	gatcacctac	accggcgtcg	agctgcgggc	6300
cgacgtac	gaactgggt	ggcagcagg	gttggagtgac	gcgaagcgc	cccctatcg	6360
cgagccgatc	accttcacgt	tctacagat	ttgcccaggac	ctggcgttgg	cgatcaatgg	6420
ccggattac	acgaaggccg	aggaatgcct	gtcgccct	caggcgcacgg	cgatggcctt	6480
cacgtccgac	cgcgttgggc	acctgaaatc	ggtgtcgct	ctgcaccgc	tccgcgtcct	6540

ggaccgtggc aagaaaaacgt cccgttgcga ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcggtct 6600
 gtttgcgtggc gaccactaca cgaattatc atgggagaag taccgcaagc tgcgcgcac 6660
 ggccccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggg ccgtacccgc tcaagctgg 6720
 aacctccgc ctcatgtgcg gatcgattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcagg 6780
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggg gaacacgcct gggtaatga 6840
 tgacottggc cattgcaaac gctagggcct tgggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaagaaaca agcgggact gctcgacca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgtc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattt tgattaaggc tcagattcga cggcctggg cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggccgggtc cggttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcggtc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgcga tctgtccggc gtttcgtgg agccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgccg gtatgctgct gcccgggtt ccggccgggtt tattgctcgat gatgatcg 7380
 cgacagattc caacgggaat ctggtggtg cgcatttc tccctggcgc acttaatatt 7440
 tcgctattct ggagcttgg ttttatttcg gtctaccggc tgccgggggg ggtcgccgg 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgcgcgtct gctaggtac 7560
 ccgatacgat tgatggcggt cctggggctt atttgcggaa ctgcgggggtt ggcgtgtt 7620
 gtgttgcacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcggtc cagggggctt ggcgggggg 7680
 gtttccatgg cggtcggaac cgtgctgacc cgcgtggc aaccccggtt ggcctcgctc 7740
 accttacccg cctggcaact ggcggccggaa ggacttctgc tggcccgat agctttatgt 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tccgcctggc gtcggccgg 7860
 ctgatcgagg cgggtttaac ctacttcctt tgggtccggg ggtatcgatc actcgaaacct 7920
 acagttgttt ctttactggg ctttctcagc cccagatctg ggtcgatca gcccggggat 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcggttcc ccgcgttgc ccattcggtg agcaatggat 8040
 agggggagttt atatcgtaa ctggccgttcc taaagaaata ggcgcactca gtcggccgtt 8100
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatacgatc tcaagatcga cagcgttca 8160
 cggtaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggc tctctcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcattc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcattcggtt ttcaaaacccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tccgttacat 8340
 gagcaagtc tgccgcctt caacgctct cccgctgacg ccgtccggaa ctgtgggtt 8400
 gcctgtatcg agtgggtatt ttgtggcgag ctgcgggtcg gggagctgtt ggtggctgg 8460
 tggcaggata tattgtgggt taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattcg 8520
 gacgtttta atgtactggg gtgggttttc ttttccacccat tgagacgggc aacagctgt 8580
 tgcccttcac cgccctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgcgt gtttgcggcc 8640
 gcaggcgaaa atcctgtttt atgggttttc cgaaatcgcc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgc tccagtttgg aacaagagtc cactattaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat caggcgatg gcccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgagggtgc cgtaaagcac taaatcgaa 8880
 ccctaaaggg agccccccgt ttagagcttgc acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaagggaag aaagcgaaag gagcggcgcc cattcaggct ggcgaactgt tgggaagg 9000
 gatcggtcgcc ggccttcgtt ctattacggc agctggcgaa agggggatgt gtcgcacggc 9060
 gattaagttt ggttaacgcca gggtttccc agtcacgcgt ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaatattt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaaatt tattgatgca agttttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatacg ctggtacatt gccgttagatg aaagactgag tgcgtatatta 9300
 tgtgttaatac ataaatttgc gatatacgat gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgcgtcagaa gaactcgatc agaaggcgat agaaggcgat ggcgtcgaa 9420
 tcggggcgcc cgataccgtt aagcacgagg aagcggtcg cccatcgcc gccaagctct 9480
 tcagcaatcat caccgggttagc caacgcgtatc tcctgtatgc ggtccgcac acccagccgg 9540
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcgccca ttttccacca tgatattcgga caagcaggca 9600
 tcgcccattggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc ggccttgc gctggcgaa 9660
 agttcggtcg ggcgcggccctt gtcgtatcgat tccatcgatc gacaagaccc 9720
 gcttcatcc gactacgtgc tcgctcgatc cgatgtttcg tttgggtggc gaatggggcag 9780

96

gtagccggat caagcgtatg cagccggcgc attgcatacg ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgccaa tagcagccag 9900
 tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggAACGCC cgTCGtggcc 9960
 agccacgata gccgcgctgc ctcgtcctgc agttcattca gggaccggc caggtcggtc 10020
 ttgacaaaaa gaaccggcgc cccctgcgt gacagccggc acacggcgc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtccca gtcatacgcc aatagcctct ccacccaagc ggccggagaa 10140
 cctgcgtgca atccatctt ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg agggaaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat tttgacaag aaatattgc tagctgatacg tgaccttagg cgactttga 10320
 acgcgcataa atggtttctg acgtatgtgc tttagctcatt aaactccaga aacccggcgc 10380
 tgagtggtc cttcaacgtt gcgggtctgt cagttccaaa cgtaaaaacgg cttgtcccg 10440
 gtcatcgccg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatcccc 10500
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
 cttaccagag ggcgcggccag ctggcaattc cggttcgtt gctgtccata aaaccggcca 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gcccaactgca agtacactgc tttctcttg cggttgcgtt 10680
 ttcccttgc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgg 10740
 actggcttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttgc cggccgtgt gcttgcggca 10800
 gcgtgaagct tgcatacgcc caggtcgacg ggcgcggcag ctccctcgac aaatttacac 10860
 attgcaacta aacgtctaaa cccttgcataat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgt 10920
 tttgatttgc gataaattt tatatttgcataaaattta taacacctt tatgctaacg 10980
 tttgcaaca ctttagcaatt tgcaagttga ttaatttgatt ctaaatttatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgtaa atatttgcataatttctta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgtgc aatgctgcat 11160
 ggcgcata tacaccaaaac attcaataat tcttgggat aataatggta ccacacaaga 11220
 tttgagggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta attttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatacgat ggcgcgccttgc tggaaatgtt aaaaatattt 11340
 tggaaatgtat ttgcataggaa ggcatacgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaaatt tacatgcaac tagttatgca tggatgttatataatgagga 11460
 ttttgcataa ctttcattca tacacactca ctaagtttca caccattata attttccat 11520
 agccagcaga tctggccggca tcgatccccggc ggcatacgcttgc gctttaatgtatgcg 11580
 acgcctatgat tcgcatgata ttgcatttca attctgttgc gacatgttgc aaaaacctga 11640
 gcatgtgttag ctcagatccat taccggccgtt ttcgggttcat tctaattgtat atatcaccgg 11700
 ttactatcgat atttttatgtatataatattctt ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760
 gctcgccgcgc cctcttagagg atcgatgat tcaatcgatc tgactggcgc cttcaacgtt 11820
 gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaaacgg cttgtcccgcc gtcatacgcc ggggtcataa 11880
 cgtgactccc ttaattctcc gtcatacgatc agattgtcgat ttcccgccctt cagttttaaac 11940
 tatcagtgtt tgacaggata tattggccggg taaaacctaag agaaaagagc gtttattttaga 12000
 ataatcgat attaaaaagg gcgtaaaaag gtttattccctt cgtccatttgc tatgtgcatt 12060
 ccaaccacag ggttccccca 12079

<210> 67

<211> 13002

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit zwei Promotor-Terminator-Expressionskassetten

<400> 67

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgac gcccggaaacg atccgacacg 60
 gcgcccgac caggtgcgc ggcggaaattgc accaacgcac acagccgcag cagaatgcac 120
 tagtggccgg tgacgtcgat cagatgcgc gggggccggc cagcaccggc 180

ataatcaggc	cgatgccgac	agcgtcgagc	gacgacagtgc	tcagaattac	gatcaggggt	240
atgttgggtt	tcacgtctgg	cctccggacc	agcctccgct	ggtccgattt	aacgcgcgga	300
ttctttatca	ctgataagtt	ggtggacata	ttatgtttat	cagtataaa	gtgtcaagca	360
tgacaaaagtt	gcagccgaat	acagtatcc	gtgccgcct	ggacctgtt	aacgaggctg	420
gcgttagacgg	tctgacgaca	cgaaactgg	cggaacgggt	gggggttcag	cagccggcgc	480
tttactggca	cttcaggaac	aagccggcgc	tgctcgacgc	actggccgaa	gccatgctgg	540
cggagaatca	tacgcattcg	gtgccgagag	ccgacgacga	ctggcgctca	tttctgtatcg	600
ggaatgcccgg	cagtttcagg	caggcgctgc	tcgcctaccg	cgatggcgcg	cgcatccatg	660
ccggcacgcg	accggggcgc	ccgcagatgg	aaacggccga	cgcgcagctt	cgcttcctct	720
gcgaggcggg	tttttcggcc	ggggacgccc	tcaatgcgc	gatgacaatc	agctacttca	780
ctgttggggc	cgtgttttag	gagcaggccg	gacgacgca	tgccggcgag	cgcggcggca	840
ccgttgaaca	ggtccgcgc	tcgcccgtgt	tgccggccgc	gatagacgccc	ttcgacgaag	900
ccggtccgg	cgcagcgttc	gagcaggac	tcgcgggtat	tgtcgatgga	ttggcgaaaa	960
ggaggcttgt	tgtcaggaac	gttgaaggac	cgagaaagg	tgacgattga	tcaggaccgc	1020
tgccggagcg	caacccactc	actacagcag	agccatgtag	acaacatccc	ctcccccttt	1080
ccacccgcgtc	agacgcccgt	agcagccgc	tacgggctt	ttcatgcctt	gccctagcgt	1140
ccaaggctca	cgccgcgcgt	cgccctctct	ggccgccttc	tggcgcctt	ccgcttcctc	1200
gctcaactgac	tcgctgcgc	cggtcggtcg	gtgcggcga	gcggtatcag	ctcaactcaaa	1260
ggcgtaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	1320
aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaaa	ggccgcgtt	ctggcgttt	tccataggct	1380
ccgccccct	gacgagcattc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccgcac	1440
aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	tgaaagctcc	ctcgctgc	ctcctgttcc	1500
gaccctgccc	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgcttt	1560
ccgctgcata	accctgcttc	ggggcattta	tagcatttt	tgcgttat	ccatccttt	1620
tcgcacgata	tacaggattt	tgccaaagg	tgcgtttaga	ctttccttgg	tgtatccaac	1680
ggcgtcagcc	gggcaggata	ggtgaagtag	gcccacccgc	gacgggtgt	tccttcttca	1740
ctgtccctta	ttcgcacctg	gcccgtctca	acgggaatcc	tgctctgc	ggctggccgg	1800
ctaccgcgg	cgtaaacagat	gagggcaagc	gatggctga	tgaaacccaag	ccaaccagga	1860
agggcagccc	acctatcaag	gtgtactgccc	ttccagacga	acgaagagcg	attgaggaaa	1920
aggcggcggc	ggccggcattg	agcctgtcg	cctacctgt	ggccgtcg	cagggctaca	1980
aaatcaacggg	cgtcgtggac	tatgacgacg	tcgcgcgcgt	ggccgcgc	aatggcgacc	2040
tggccgcct	gggcggcctg	ctgaaactct	ggctcaccga	cgacccgc	acggcgcgt	2100
tcggtgatgc	cacgatcc	gcccgtctgg	cgaagatcga	agagaagcag	gacgagctg	2160
gcaaggatcat	gatggggcgt	gtccggccga	gggcagagcc	atgactttt	tagccgtt	2220
aacggccggg	gggtgcgcgt	gattgcaag	cacgtcccc	tgcgctccat	caagaagagc	2280
gacttcgcgg	agctgggtaa	gtacatcacc	gacgagcaag	gcaagaccga	gccccttgc	2340
gacgctcacc	gggctgggtt	ccctcgccgc	tgggctggcg	gcccgtatg	gcccgtcaaa	2400
cgcgcagaa	acgcgtgtc	agccgtgtc	gagacaccgc	ggccgcggc	tttgcgttgc	2460
cctcgoggaa	aacttggccc	tcactgacag	atgaggggg	gacgttgaca	tttgaggggc	2520
cgactcacc	ggcgccggcgt	tgacagatga	ggggcaggct	cgatttcggc	cgccgacgt	2580
gagctggcca	gcctcgcaaa	tcggcgaaaa	cgcctgattt	tacgcgat	ttccacagat	2640
gatgtggaca	agcctgggg	taagtgcct	gcccgtattt	caacttgc	tttttttttt	2700
tgacagatga	ggggcgcgt	ccttgacact	tgaggggc	agtgtgtaca	gatgaggggc	2760
gcacctattt	acatttgagg	ggctgtccac	aggcagaaaa	tccagcattt	gcaagggtt	2820
ccgcccgtt	ttcggccacc	gctaaccctgt	cttttaacc	gctttaaac	caatatttt	2880
aaacctgtt	tttaaccagg	gctgcgcct	gtgcgcgt	ccgcgcacgc	cgaagggggg	2940
tgccccccct	tctcgaaacc	tcccgcccc	ctaacgcggg	cctccatcc	ccccaggggg	3000
tgcccccctc	ggccgcgaac	ggcctcacc	caaaaatggc	agcgctggca	gtccttgcca	3060
ttgcccggat	cggggcagta	acgggatgg	cgatcagccc	gagcgcgacg	cccgaaagca	3120
ttgacgtgcc	gcagggtctg	gcatcgacat	tcagcgacca	ggtgcgggc	agtgaggggc	3180
gcggccctgg	tggccggctg	cccttcactt	cggccgtcg	ggcattcaca	gacttcatgg	3240
cggggccggc	aattttacc	ttggcattc	ttggcatagt	ggtgcgggt	gccgtgtcg	3300
tgttcgggg	tgcgataaac	ccagcgaacc	atttggatgt	atagtaaga	ttataccgag	3360
gtatgaaaac	gagaattgga	cctttacaga	attactctat	gaagcgc	atttaaaaag	3420

ctaccaagac	gaagaggatg	aagaggatga	ggaggcagat	tgcccttgaat	atattgacaa	3480
tactgataag	ataatataatc	ttttatatacg	aagatatacg	cgtatgtaa	gatttcagg	3540
ggcaaggcat	aggcagcgcg	cttatacaata	tatctataga	atggccaaag	cataaaaact	3600
tgcatggact	aatgcttga	acccaggaca	ataaccttac	agcttgtaa	ttctatcata	3660
atgggtaat	gactccaact	tattgatagt	gttttatgtt	cagataatgc	ccgatgactt	3720
tgtcatgcag	ctccaccat	tttgagaacg	acagcgactt	ccgtcccagc	cgtgccaggt	3780
gctgcctcag	attcaggta	tgccgctcaa	ttcgtcgct	atatcgctt	ctgattacgt	3840
gcagcttcc	cttcaggcgg	gattcataca	gcggccagcc	atccgtcatc	catacacca	3900
cgtcaaagg	tgacagcagg	ctcataagac	gccccagcgt	cgccatagt	cgttcaccga	3960
atacgtgcgc	aacaaccgtc	ttccggagac	tgtcatacgc	gtaaaacacg	cagcgctggc	4020
gcgatttagc	cccgacatag	ccccactgtt	cgtccatttc	cgcgcagacg	atgacgtcac	4080
tgcccgctg	tatgcgcgag	gttaccgact	gcggcctgag	tttttaagt	gacgtaaaat	4140
cgtgtgagg	ccaacgccc	taatgcgggc	tggtgcccgg	catccaacgc	cattcatggc	4200
cataatcaatg	attttctgg	gcgtaccggg	ttgagaagcg	gtgtaagtga	actgcagtt	4260
ccatgttta	cggcagttag	agcagagata	gctgtatgt	ccggcggtgc	ttttgcccgtt	4320
acgcaccacc	cggtcagtag	ctgaacacg	gggacagcgt	atagacacag	aagccactgg	4380
agcacctcaa	aaacaccatc	atacactaaa	tcaagtatgt	ggcagcatca	cccataattt	4440
tggttcaaa	atcggctccg	tcgataactat	gttatacgc	aactttgaaa	acaactttga	4500
aaaagctgtt	ttctgttatt	taaggttta	gaatgcacgg	aacagtgaat	tggagttcgt	4560
cttgttataa	ttagcttctt	gggttatctt	taaatactgt	agaaaaagagg	aaggaaataa	4620
taaatggcta	aaatgagaat	atcaccggaa	ttgaaaaaaac	tgatcgaaaa	ataccgctgc	4680
gtaaaagata	cggaaggaat	gtctcctgt	aaggtatata	agctgggggg	agaaaatgaa	4740
aacctatatt	taaaaatgac	ggacagccgg	tataaaggaa	ccacctatga	tgtggAACGG	4800
gaaaaggaca	tgatgctatg	gctggaaagg	aagctgcctg	ttccaaaggt	cctgcacttt	4860
gaacggcatg	atggctggag	caatctgctc	atgagtgggg	ccgatggcgt	cctttgctcg	4920
gaagagtatg	aagatgaaca	aagccctgaa	aagattatcg	agctgtatgc	ggagtgcac	4980
aggcttttc	actccatcg	catactggat	tgtccctata	cgaatagctt	agacagccgc	5040
ttagccaaat	tggattactt	actgaataac	gatctggccg	atgtggattt	cgaaaactgg	5100
gaagaagaca	ctccattaa	agatccgcgc	gagctgtatg	atttttttaaa	gacggaaaag	5160
cccgaagagg	aacttgcctt	ttcccacggc	gacctggggag	acagcaacat	ctttgtgaaa	5220
gatggcaaag	taagtggctt	tattgatctt	gggagaagcg	gcagggcgga	caagtggat	5280
gacattgcct	tctgcgtccg	gtcgatcagg	gaggatatcg	gggaaaaca	gtatgtcgag	5340
ctatttttt	acttactggg	gatcaaggct	gattgggaga	aaataaaaata	ttatatttt	5400
ctggatgaat	tgttttagta	cctagatgt	gctgtacgt	gcccgtcgat	gccggcgaca	5460
caccgacttc	ttccgcac	agtgtttgg	ctctcaggcc	gaggcccacg	agcaggagcg	5520
gggcaagggg	tcgctggat	tcgtgcagg	caagattcgg	aataccaat	acgagaagga	5580
cggccagacg	gtctacggg	ccgacttcat	tgccgataag	gtggattatc	tggacaccaa	5640
ggcaccaggc	gggtcaaaatc	aggaataagg	gcacattgccc	ccggcgtgag	tcggggcaat	5700
cccgcaagga	gggtgaatga	atcggacgtt	tgaccggaag	gcatacaggc	aagaactgtat	5760
cgacgcgggg	ttttccgccc	aggatgccc	aaccatcgca	agccgcaccc	tcatgcgtgc	5820
gccccgcgaa	accttccagt	ccgtcgctc	gatggtccag	caagctacgg	ccaagatcg	5880
gcgcgcac	gtgcaactgg	ctccccctgc	cctgcccgc	ccatcgccg	ccgtggagcg	5940
ttcgcgtcgt	ctcgaacagg	aggcggcagg	tttggcgaag	tcgatgacca	tcgacacgc	6000
aggaactatg	acgaccaaga	agcgaaaaac	cgccggcgg	gacctggcaa	aacaggtcag	6060
cgaggcgaag	caggccgcgt	tgctgaaaca	cacgaagcag	cagatcaagg	aatgcagct	6120
ttccttggtc	gatattgcgc	cgtggccg	cacgatgc	gcgtatccaa	acgacacggc	6180
ccgctctgcc	ctgttacca	cgcgcacaa	gaaaatccc	cgcgaggcgc	tgccaaacaa	6240
ggtcatat	cacgtcaaca	aggacgtgaa	gatcacctac	accggcgtcg	agctgcgggc	6300
cgacgtgac	gaactgggt	ggcagcagg	gttggagtac	gcgaagcg	ccccatcg	6360
cgagccgatc	accttcacgt	tctacgagct	ttgcccaggac	ctgggctgg	cgatcaatgg	6420
ccggattttac	acgaaggccg	aggaatgcct	gtcgccct	caggcgcacgg	cgatgggctt	6480
cacgtccgac	cgcgttggc	acctgaaatc	ggtgtcgct	ctgcacccgt	tccgcgtct	6540
ggaccgtggc	aagaaaacgt	cccgttgc	ggtcctgatc	gacgaggaaa	tcgtcgat	6600
ttttgctggc	gaccactaca	cgaaattcat	atgggagaag	taccgcac	tgtcggccgac	6660

ggcccgacgg atgttcgact attcagctc gcaccgggag ccgtacccgc tcaagctgga 6720
 aacctccgc ctcatgtcg gatcgattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggtaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaaac gctagggcct tgggggtca ttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaaggaaca agcgggcaact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgtc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcgcc cctgaagaaa gctccagaga ttccgggtc cgtttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcggtc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcga tctgtccggc gtttcgtgg agccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgccg gtatgctgct gcgggcttg ccggcgggtt tattgctcgat gatgatcg 7380
 cgacagattc caacggaaat ctggggatg cgcatttc tccctggc acttaatatt 7440
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccggc tgccggcgg ggtcgccggcg 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgcgcgtct gctaggttagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggt cctggggctt atttgcggaa ctgcggcgtt ggcgctgtt 7620
 gtgttgcacac caaacgcagc gctagatcct gtgcggcgtc cagcggccct ggcggggccg 7680
 gtttccatgg ctttcggaaac cgtgctgacc cgcaagtggc aaccccccgt gcctctgctc 7740
 accttaccg cttggcaact ggccggccga ggacttctgc tcgttccagt agcttagt 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcg 7860
 ctgatcgag cgggtttaac ctacttcctt tgggtccggg ggatctcgactcgaac 7920
 acagttgttt ctttactggg ctttctcagc cccagatctg ggtcgatca gcccggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa ctgcgggtcc ccgacctgtt ccattcggtt agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtaa ctttcacttc taaaagaaaata gcccactca gtttcctcag 8100
 cggcttatac cagcgatttc ctattatgtc gcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggtaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggaa tctctgcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggccggcaacg ctctgtcata ttacaatca acatgttacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaacccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtccgggatgatggct 8400
 gcctgtatcg agtgggtatt ttgtggcggat ctgcggcgtc gggagctgtt ggctggctt 8460
 tggcaggata tattgtgggt taaaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 gacgtttta atgtactggg gtggtttttc ttttaccat tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgcgtt gtttgcggca 8640
 gcaggcgaaa atccgtttt atgggtttcc agtgcacgcgtt ccggatcgaaaaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgc tccagttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat caggcgatg gcccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gtttttggg gtcgagggtgc cgtaaagcac taaatcgaa 8880
 ccctaaaggg agcccccgtt ttagagcttgc acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaaggaaag aaagcgaaag gagcggcgc cattcaggct ggcgaactgt tgggaagggg 9000
 gatcggtgcg ggccttcgc ctattacgc agtggcgaa agggggatgt gtcgaaggc 9060
 gattaagttg ggttaacgcgc ggttttccc agtgcacgcgtt ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttggaaa gaaatatagt taaaatattt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggttattatag tccaagcaaa aacataaaatt tattgtatca agttaaattt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatcgt ctggtacatt gccgttagatg aaagactgag tgcgtatatta 9300
 tttgtatatac ataaatttattt gatatacgat gtttagctca tcggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgatc agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
 tcgggagcgg cgataccgtt aagcacgagg aagcggcgtc cccattcgcc gccaagctct 9480
 tcagcaatat cacgggtgcg caacgcgtatg ttccgtatgc ggtccggccac acccagccgg 9540
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcgccca tttccacca tggatattcgg caagcaggca 9600
 tcggccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggatgc ggccttgcgatc cttggcgaac 9660
 agttcggtcg ggcgcggccctt ctgtatgc tggatgttgc cttgggggtc gaaatggcag 9720
 gttccatcc ggtacgtgc tcgtcgatgc gatgtttcg cttgggggtc gaaatggcag 9780
 gtagccggat caagcgtatg cagccggccgc attgcgtatc ccatgtatggatcgttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900

100

tcccttcccc	cttcagtgac	aacgtcgagc	acagctgcgc	aaggaacgcc	cgtcggtggcc	9960
agccacgata	gccgcgtgc	ctcgctcgc	agttcatca	ggcacccgga	caggcggtc	10020
ttgacaaaaa	gaaccggggc	ccctcgct	gacagccga	acacggcgcc	atcagagcag	10080
ccgattgtct	gttgcggca	gtcatagccg	aatagcctct	ccacccaagc	ggccggagaa	10140
cctcggtgca	atccatctt	ttcaatccaa	gctccatgg	gccctcgact	agagtcgaga	10200
tctggattga	gagtgaatat	gagactctaa	ttggataccg	agggaaattt	atggAACGTC	10260
agtggagcat	ttttgacaag	aaatatttgc	tagctgatag	tgaccttagg	cgactttga	10320
acgcgcaata	atggtttctg	acgtatgtgc	ttagctcatt	aaactccaga	aacccgccc	10380
tgagtggtc	tttcaacgtt	gccccgtctgt	cagttccaaa	cgtaaaaacgg	cttgcggcc	10440
gtcatcgccg	gggggtcataa	cgtgactccc	ttaattctcc	gctcatgatc	ttgatcccc	10500
gcccacatcag	atccctggcg	gcaagaaaagc	catccagtt	actttgcagg	gttcccaac	10560
cttaccagag	ggcgccccag	ctggcaattc	cggttcggtt	gctgtccata	aaaccgccc	10620
gtctagctat	ccccatgtaa	gcccaactgca	agctacctgc	tttctcttt	cgcttgcgtt	10680
ttcccttgc	cagatagccc	agtagctgac	attcatccgg	ggtcagcacc	gtttctgcgg	10740
actggcttcc	tacgtgttcc	gtttccctta	gcagcccttg	cgccctgagt	gcttgcggca	10800
gcgtgaagct	tgcatgcctg	caggcgacg	gccccggag	ctcctcgagc	aaatttacac	10860
attgcacta	aacgtctaaa	cccttgcata	ttgttttgc	tttactatgt	gtgttatgt	10920
tttgatttgc	gataaaattt	tatatttgc	actaaattt	taacacctt	tatgctaacg	10980
tttgccaaca	cttagcaatt	tgcaagttga	ttaatttgatt	ctaaatttatt	tttgcattt	11040
aaatacatat	actaatcaac	tggaaatgt	aatatttgc	aatatttcta	ctataggaga	11100
attaaagtga	gtgaatatgg	taccacaagg	tttggagatt	taattttgc	aatgctgcat	11160
ggatggcata	tacaccaaac	attcaataat	tcttgaggat	aataatggta	ccacacaaga	11220
tttgaggtgc	atgaacgtca	cgtggacaaa	aggtttagta	attttcaag	acaacaatgt	11280
taccacacac	aagttttgag	gtgcgtgc	gatgcccctg	tggaaagttt	aaaaatattt	11340
tggaaatgt	ttgcgtggaa	gccatgtgt	aaaccatgac	atccacttgg	aggatgcaat	11400
aatgaagaaa	actacaaatt	tacatgcaac	tagttatgca	tgttagtctat	ataatgagga	11460
ttttgcaata	ttttcatttca	tacacactca	ctaagtttta	cacgattata	atttcttcat	11520
agccagccca	ccgcgggtgg	cggccgcctg	cagtctagaa	ggcctcctgc	tttaatgaga	11580
tatgcgagac	gcctatgatc	gcatgatatt	tgctttcaat	tctgttgc	acgttgtaaa	11640
aaacctgagc	atgtgttagct	cagatcctt	ccgccccgtt	cggttcattc	taatgaatat	11700
atcacccgtt	actatcgat	ttttatgat	aatatttctt	gttcaatttta	ctgattgtcc	11760
gtcgagcaaa	tttacacatt	gccactaaac	gtctaaaccc	ttgttaatttgc	tttttgcattt	11820
actatgtgt	ttatgtattt	gatttgcgt	aaatttttat	atttggact	aaatttataaa	11880
cacctttat	gctaacgttt	gccaacactt	agcaatttgc	aagttgatta	attgatttca	11940
aatttatttt	gtttcttaaa	tacatatact	aatcaactgg	aaatgtaaat	atttgctaat	12000
atttctacta	taggagaatt	aaagtggat	aatatggtac	cacaaggttt	ggagattttaa	12060
ttgttgcata	gtgcgtggaa	tggcatatac	accaaacatt	caataatttct	tgaggataat	12120
aatggtacca	cacaagattt	gaggtgcgt	aacgtcacgt	ggacaaaagg	tttagtaatt	12180
tttcaagaca	acaatgttac	cacacacaag	tttggagtttgc	catgcgtggaa	tgccctgtgg	12240
aaagttaaa	aatattttgg	aatatgttt	catggaaagcc	atgtgtaaaa	ccatgacatc	12300
cacttggagg	atgcaataat	gaagaaaact	acaaatttac	atgcaactag	ttatgcattgt	12360
agtctatata	atgaggattt	tgcaataactt	tcattcatac	acactacta	agttttacac	12420
gattataatt	tcttcatacg	cagcgatcc	gatatcgccc	ccgctagcgt	taaccctgtct	12480
ttaatgagat	atgcgagacg	cctatgatcg	catgatattt	gtttcaattt	ctgttgcata	12540
cgttgtaaaa	aacctgagca	tgttagtcc	agatccttac	cgccggtttgc	ggttcatttct	12600
aatgaatata	tcacccgtt	ctatcgat	tttatgataa	atatttccgc	ttcaattttac	12660
tgattgtccg	tcgacgaatt	cgagctggc	ggccctctag	aggatcgat	aattcagatc	12720
ggctgagttgg	ctcccttcaac	gttgcgttgc	tgtcgttcc	aaacgtaaaa	cggttgcgttgc	12780
cgcgtcatcg	gcgggggtca	taacgtgact	cccttaattt	tccgctcatg	atcagattgt	12840
cgtttccgc	cttcagttt	aactatcgat	gtttgacagg	atatattggc	gggtaaacact	12900
aagagaaaag	agcgtttattt	agaataatcg	gatattttaaa	aggcggtgaa	aaggtttatc	12960
cttcgtccat	ttgtatgtgc	atgccaacca	cagggttccc	ca		13002

<210> 68

<211> 13905

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit drei Promotor-Terminator-Expressionskassetten

<400> 68

gatctggcgc	cggccagcga	gacgagcaag	attggccgcc	gcccggaaacg	atccgacagc	60
gcgcccagca	cagggtgcga	ggccaaattgc	accaaacgcac	acagcgccag	cagaatgcac	120
tagtggcggt	tgacgtcggt	cgagtgaaacc	agatcgccca	ggaggccccgg	cagcaccggc	180
ataatcaggc	cgatgcccac	agcggtcgagc	ggcacagtgcc	tcagaattac	gatcagggggt	240
atgttgggtt	tcacgtctgg	cctccggacc	agcctccgct	ggtccgattt	aacgcgcgga	300
ttctttatca	ctgataagg	ggtggacata	ttatgtttat	cagtgataaa	gtgtcaagca	360
tgacaaagtt	gcagccgaat	acagtgtatcc	gtgcgcgcct	ggacactgtt	aacgagggtcg	420
gcgttagacgg	tctgacgaca	cgccaaactgg	cggaacgggtt	gggggttcag	cagccggcgc	480
tttactggca	cttcaggaac	aaggccccgc	tgctcgacgc	actggccgaa	gccatgttgg	540
cggagaatca	tacgcattcg	gtgcccggag	ccgacgacga	ctggcgctca	tttctgtatcg	600
ggaatgccc	cagttcagg	caggcgctgc	tcgccttaccg	cgatggcg	cgcacatccatg	660
ccggcacgcg	accggggcgc	ccgcacatgg	aaacggccgc	cgcgcacgtt	cgcttcctct	720
gcgaggcggg	tttttcggcc	ggggacgcgc	tcaatgcgt	gatgacaatc	agctacttca	780
ctgttgggc	cgtgttttag	gagcaggccg	gcgcacagcg	tgccggcgag	cgcggcggca	840
ccgttgaaca	ggctccgctc	tcgcgcgtgt	tcgcggccgc	gatagacgcc	ttcgacgaag	900
ccgggtccgga	cgcagcggtt	gagcaggac	tcgcgggtat	tgtcgtatgg	ttggcgaaaa	960
ggagggtcg	tgtcaggaac	gttgaaggac	cgagaaagg	tgacgatttga	tcaggaccgc	1020
tgccggagcg	caacccactc	actacagcag	agccatgtt	acaacatccc	ctcccccctt	1080
ccacccgcgc	agacgcccgt	agcagccccgc	tacgggcctt	ttcatgcctt	gccctagcgt	1140
ccaaaggctca	cggccgcgc	cggccctct	gcggcccttc	tggcgctt	ccgcttcctc	1200
gctcaactgc	tcgcgtcgct	cggcgttgc	gtgcggcg	gcggtatcag	ctcaactcaaa	1260
ggcggtataa	cgggttatcca	cagaatcagg	ggataacgc	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	1320
aggccagca	aaggccagga	accgtaaaaaa	ggccgcgtt	ctggcgttt	tccataggct	1380
ccgccccccct	gacgagcattc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccgac	1440
aggactataa	agataccagg	cgtttccccc	tggaaagctcc	ctcggtcgct	ctccgttcc	1500
gaccctgccc	cttacccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgcttt	1560
ccgctgcata	accctgcctt	ggggtcatta	tagcgatttt	ttcggtatat	ccatccttt	1620
tcgcacgata	tacaggattt	tgcacaaagg	tgcgtgtaga	ctttccttgg	tgtatccaa	1680
ggcgtcagcc	gggcaggata	ggtgaagtag	gcccacccgc	gagcgggtgt	tccttcttca	1740
ctgtccctta	ttcgcacactg	gcgggtctca	acgggaatcc	tgctctgc	ggctggccgg	1800
ctaccgcgcgg	cgtaacagat	gaggcaagc	ggatggctga	tggaaaccaag	ccaaaccagg	1860
agggcagccc	acctatcaag	gtgtactgca	ttccagacga	acgaagagcg	attgaggaaa	1920
aggcggccgc	ggccggcattg	agcctgtcg	cctacctgt	ggccgtcg	cagggttaca	1980
aaatcacggg	cgtcggtggac	tatgagcacg	tccgcgagct	ggcccgcatc	aatggcgacc	2040
tggggccgc	ggggccgcct	ctgaaactct	ggctcaccgc	cgacccgcgc	acggcgcgg	2100
tcgggtatgc	cacgatccctc	gcccgttgg	cgaagatcg	agagaagcg	gacgagctt	2160
gcaaggatcat	gttggcggt	gtccggccga	gggcagagcc	atgactttt	tagccgctaa	2220
aacggccggg	gggtgcgcgt	gattgcaag	cacgtcccc	tgcgcctt	caagaagagc	2280
gacttcgcgg	agctgtgtgaa	gtacatcacc	gacgagcaag	gcaagaccga	gccccttgc	2340
gacgctcacc	gggctgggtt	ccctcgccgc	tgggtggcg	gccgtctatg	gccctgc	2400
cgcgccagaa	acgcccgtcg	agccgtgtgc	gagacaccgc	ggccgcggc	gttgtggata	2460
cctcgccgaa	aacttggccc	tcactgacag	atgagggcgc	gacgttgaca	cttgaggggc	2520

cgactcaccc ggccggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgatt tacgcgagtt tccccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggta taagtgcctt gccgtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgt ccttgacact tgagggcag agtgcgtaca gatgagggc 2760
 gcacctattg acatttgggg ggctgtccac aggagaaaa tccagcattt gcaagggtt 2820
 cccgggttt ttcggccacc gctaaccctgt cttttaacct gctttaaac caatatttat 2880
 aaacccctgtt ttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga cgcgcacgc cgaaggggg 2940
 tgccccccct tctcgAACCC tccggcccg ctaacgcggg cctccatcc ccccaggggc 3000
 tgccggccctc ggccgcgaac ggcctcaccc caaaaatggc agcgcgtggca gtccttgcca 3060
 ttggccggat cggggcagta acggatggg cgatcagccc gaggcgcacg cccggaaagca 3120
 ttgacgtgcc gcagggtctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggctg cccttcaactt cggccgtcgg ggcattcagc gacttcatgg 3240
 cggggccggc aatttttacc ttggcattt ttggcatagt ggtgcgggt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggtg ataggtaaat ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaatttggc ctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccctgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataataatatac ttttatatac aagatatcgc cgtatgtaaag gatttcagg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atggcAAAG cataaaaaact 3600
 tgcatggact aatgcttggaa acccaggaca ataaccttatac agcttggaa ttctatcata 3660
 attggtaat gactccaact tattgatagt gttttatgtt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgcattgcag ctccaccat tttgagaacg acagcgaactt ccgtcccagc cgtgccagg 3780
 gctgcctcag attcagggtt tgccgctcaa ttgcgtcgat atatcgctt ctgattacgt 3840
 gcagcttcc cttcaggcgg gattcataca gcccggcaggcc atccgtcatc catatcacca 3900
 cgtcaaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cggtcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgcataacgc gtaaaacacgc cagcgtggc 4020
 gcgatttagc cccgacatag ccccactgtt cgtccatttc cgccgcacgc atgacgtcac 4080
 tgccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcccggcttag tttttaaat gacgtaaaat 4140
 cgtgttgagg ccaacgcccc taatgcgggc tggcccccgc catccaaacgc cattcatggc 4200
 catataatg attttctggt gcttaccggg ttgagaagcg gtgtaaatgtaa actgcagttt 4260
 ccatgtttta cggcagttag agcagagata gcgctgtatgt cccgggtgc ttttggcgtt 4320
 acgcaccacc cccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcgtaaatgtt ggcagcatca cccataattt 4440
 tggtttcaaa atcggctccg tcgataactat gttatacgcc aactttggaa acaactttga 4500
 aaaagctgtt ttctgttatt taaggtttta gaatgcagg aacagtgaat tggagtttgt 4560
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatgcaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaaggaaat gtctctgtt aaggtatata agctgggtgg agaaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacccatgtg tggaaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgcctat gctggaaaggaa aagctgcctg ttccaaagggt cctgcactt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtggag ccgtggcgt ctttgcctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggcttttc actccatcga catatcgat tgcgtccatata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccaaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattt cggaaactgg 5100
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgcctt ttccacggc gacctggggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcaggcggc caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggagaaca gtatgtcgag 5340
 ctattttttgc attacttggg gatcaaggctt gattgggaga aaataaaaata ttatattttt 5400
 ctggatgaat tggatgttgcctt ccttagatgtt ggcgcacat ggcggcggaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcattca agtgggggg ctctcaggcc gaggcccacg gcaagtattt 5520
 gggcaaggggg tcgtggat tcgtgcaggc caagattcgg aataccaaatg acgagaaggg 5580
 cggccagacg gtctacgggaa ccgacttcat tggcgtggaa gttggatttgc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggc gggtaatgc aggaataagg gcacattgccc cggcgtggag tcggggcaat 5700
 cccgcaagggaa gggtaatgc atcggacgtt tgaccggaaag gcatacaggc aagaactgtat 5760

cgacgcgggg tttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccc tcatgcgtgc	5820
gccccgcgaa accttccagt cgcgtggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga	5880
gcccgcacgc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcgccg ccgtggagcg	5940
ttcgcgctgt ctgcAACAGG aggccgcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacacgc	6000
aggaactatg acgaccaaga agcggaaaaac cgcggcggag gacctggcaa aacaggtcag	6060
cgaggccaaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct	6120
ttcctgttgc gatattgcgc cgtggccgaa cacgatgcga gcgatgccaa acgacacacgc	6180
ccgctctgcc ctgttccacca cgcgcAACAA gaaaatcccgcg cgcgaggcgc tgcaaaacaa	6240
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc	6300
cgacgatgac gaactgggt ggcagcagggt ttggaggtac gccaagcga cccctatcgg	6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgcccaggac ctggcgtggc cgatcaatgg	6420
ccggattac acgaaggccc aggaatgcct gtcgcgccta caggcgcacgg cgatgggctt	6480
cacgtccgcac cgcgttgggc accttggaaatc ggtgtcgctg ctgcaccgc tccgcgtcct	6540
ggaccgtggc aaaaaacgt cccgttgcga ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct	6600
gtttgttggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgaagc tgtcgcccac	6660
ggcccacgg atgttcgact atttacgtc gcacccggag ccgtacccgc tcaagctgga	6720
aacctccgc ctcatgtgcg gatcggtttc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcagg	6780
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctgggt gAACACGCCT gggtaatga	6840
tgacctggc catttgcacac gctaggccct tttgggttca gttccggctg ggggttcac	6900
agccagcgt ttactggcat ttcagaaaca agcgggact gtcgacgc cttgcgtcgc	6960
tcagtatcgc tcgggacgc cggcgcgtc tacgaaactgc cgataaaacag aggattaaaa	7020
ttgacaattt tgatggc tcaatttcgc cggcctgggt gggccgcgt gcaggatttc	7080
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggttggc tggttacgag	7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcggtt gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc	7200
ggcgccataca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggtt tcaaacagga ggacggcccc	7260
aaggacgctc acaaggcga tctgtccggc gtttgcgtt agccgaaca gcgaggccga	7320
ggggtcgccc gtatgcgtt gccccgggtt ccggcgggtt tattgcgtt gatgatcgtc	7380
cgacagattc caacggaaat ctggggatg cgcattttca tcctcgccgc acttaatatt	7440
tcgcattttt ggagcttgc gtttatttcgc gtctaccgc tgccggggcgg ggtcgccgc	7500
acggtaggcg ctgtcagcc gctgtatggc gtgttcatct ctgcgcgtct gctaggtac	7560
ccgatacgt tgcgttggcgtt cctggggctt atttgcggaa ctgcggggcgt ggccgtgtt	7620
gtgttgcac caaaacgcgc gctagatcct gtcggcggtc cagcggggcct ggccggggcgg	7680
gtttccatgg cgttccggaa cgtgcgtacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgc	7740
acctttaccg cctggcaact ggcggccgg a gacttctgc tggttccagt agctttatgt	7800
tttgatccgc caatcccgat gcttacagga accaatgtt tcggcctggc gtggctcggc	7860
ctgatcgagg cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgac actcgaaacct	7920
acagttttt ctttactggg ctttcctcagg cccagatctg gggtcgatca gccggggatg	7980
catcaggccg acagtcggaa cttegggtcc ccgacctgtt ccattcgggtg agcaatggat	8040
aggggagttt atatcgtaa cgttcaactt taaaagaaata gcccactca gtttcctcag	8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttca tcaagatcga cagcctgtca	8160
cggtaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggta tctctcgag ggagatgata	8220
tttgatccaca ggcagcaacg ctctgtcattt gttacaatca acatgttacc ctccgcgaga	8280
tcatccgtgt ttcaaaacccg gcaatgttgcgtt ccgaatagca tcggtaacat	8340
gagcaaaatc tggccgttta caacggctt cccgctgtacg ccgtccggta ctgtatgggt	8400
gcctgtatcg agtgggtatt ttgtggcggat ctggcgttgc gggagctgtt ggctggctgg	8460
tggcaggata tattgtgggt taaaacaaatt gacgcttgcgtt caacttaata acacattgcg	8520
gacggtttta atgtactggg gtgggttttc ttttaccatgg tgagacgggc aacagctgt	8580
tgcccttcac cggcgtggcc tcggatggat gcaatgttgcgtt ccgtccggta ctgtatgggt	8640
gcaggccaaa atccgtttt atgggtggttc cgaaatcgcc aaaatccctt ataaatcaaa	8700
agaatagccc gagatagggt tgagtgttgcgtt tccagtttgcgtt aacaagagtc cactattaa	8760
gaacgtggac tcacacgtca aaggccggaaa aaccgtctat caggccgtat gcccactacg	8820
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgagggtgc cgtaaagcac taaaatcgaa	8880
ccctaaaggg agccccccat ttagagcttgcgtt acggggaaaag ccggcgaacg tggcgagaaa	8940
ggaaggaaag aaagcgaaag gacggcgcgc cattcaggct ggcgaactgt tgggaaggc	9000

gatcggtgcg ggcctttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggttaacgcga gggttttccc agtcacgcac ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttggaa gaaatatagt ttaaatattt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agttaaatt cagaatatt 9240
 tcaataactg attataatcag ctggtagcatt gccgtatag aaagactgag tgcgatatta 9300
 tgtgtataac ataaattgtat gatatacgta gcttagctca tcgggggatc cgctgaagct 9360
 agcttgggtc cgcgtcagaa gaactcgta agaaggcgat agaaggcgat ggcgtcgaa 9420
 tcgggagcgg cgataccgt aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaagctct 9480
 tcagcaatat cacgggttagc caacgcatac tcctgatagc ggtccgccc acccagccgg 9540
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc ggccttgag cctggcgaaac 9660
 agttcggctg ggcgcagccc ctgatgctc tcgtccagat catctgtatc gacaagaccg 9720
 gttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatc cgatgtttcg cttgtggtc gaatggcgag 9780
 gtagccggat caagcgtatc cagccgcgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
 tccctcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggAACGCC cgctgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgtgc ctgcgtcattc agttcattca gggcacccga caggtcggtc 10020
 ttgacaaaaaa gaaccggggc cccctgcgtc gacagccgga acacggccgc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtggcca gtcatacgcc aatagcctc ccacccaagc ggccggagaa 10140
 cttcggtc aatccatcttgc ttcaatccaa gctccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg agggaaattt atggAACGTC 10260
 agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgacccttagg cgacttttg 10320
 acgcgcataa atggttctg acgtatgtgc tttagcttatt aaactccaga aacccgcggc 10380
 tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccg 10440
 gtcatcgccg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcatacgatc ttgatccct 10500
 ggcgcatacg atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gtttcccaac 10560
 cttaccagag ggcgcggccag ctggcaattc cggttcgtt gctgtccata aaaccgcggc 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gcccactgca agctacactgc tttctctttc cgcttgcgtt 10680
 ttcccttgc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgccc 10740
 actgggttc tacgtgttcc gtttcctta gcagcccttgc gcccctgagt gtttgcggca 10800
 gcgtaagct tgcatgcctg caggtcgac ggcgcggcagg ctccctcgagc aaatttacac 10860
 attgcacta aacgtctaa cccttgaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
 tttgatttgc gataaaatttt tatatttggt actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgc aatatttcta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgtgc aatgctgcat 11160
 ggtggcata tacaccaaacc attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaaga 11220
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta attttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcgtcgt ggtggccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacattgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tggatgtctat ataatgagga 11460
 ttttgcataa ctttcattca tacacactca ctaagttta cacgattata atttcttcat 11520
 agccagccca cccgcgtggg cggccgcctg cagtctagaa ggcctctgc ttaatgaga 11580
 tatgcgagac gcttatgatc gcatgatatt tgctttcaat tctgtgtgc acgttgtaaa 11640
 aaacctgagc atgtgttagct cagatccctt cccgcgggtt cggttcattc taatgataat 11700
 atcaccggcatt actatcgat ttttatgaaat aatatttctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760
 gtcgagaaaa ttacacatt gccactaaac gtcataacc ttgttaatttgg tttttgtttt 11820
 actatgtgtg ttatgtattt gatttgcgtt aaatttttattt atttgtact aaatttataaa 11880
 cacctttat gctaacgtt gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattctt 11940
 aattttttt gtcattctaaa tacatataact aatcaactgg aatgtaaat atttgcataat 12000
 atttctacta taggagaattt aatgtgatg aatatggatc cacaagggtt ggagatttaa 12060
 ttgttgcatt gtcgtcatt gtcattatac accaaacattt caataattct tgaggataat 12120
 aatggtagcca cacaagattt gaggtgcgt aacgtcacgt ggacaaaagg ttttagtaattt 12180
 tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttggatgtt catgcattt gtcctgtgg 12240

105

aaagttaaa aatattttgg aatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc 12300
 cactggagg atgcaataat gaagaaaact acaaattac atgcaactag ttatgcattgt 12360
 agtctatata atgaggattt tgcaatactt tcattcatac acactcata agttttacac 12420
 gattataatt tcttcatacg cagcggatcc gatatcgggc ccgctagcgt taaccctgct 12480
 ttaatgagat atgcgagacg cctatgatcg catgatattt gcttcaatt ctgttgcga 12540
 cgttgtaaaa aacctgagca tgttagctc agatcctac cggccgttcc gttcattct 12600
 aatgaatata tcacccttta ctatcgatt tttatgata atattctccg ttcaatttac 12660
 tgattgtccg tcgagcaat ttacacattt ccactaaacg tctaaaccct tgtaatttg 12720
 ttttgcataa ctatgtgtt tatgtattt atttgcgata aattttata tttggacta 12780
 aatttataac acctttatg ctaacgttt ccaacacta gcaatttgc aagtgtttaa 12840
 ttgattctaa attatttttg tcttcataat acatatacta atcaactgga aatgtaaata 12900
 tttgctaata ttctactat aggagaatta aagtggatgaa atatggtacc acaagggttg 12960
 gagatttaat tggtgcattt ctgcattttt ggcattataca ccaaaccattt aataatttctt 13020
 gaggataata atggtaaccac acaagatttgg aggtgcattt acgtcacgtt gacaaaagg 13080
 ttagtaattt ttcaagacaa caatgttacc acacacaagt tttggatgtc atgcatttt 13140
 gcccgttggaa aagtttaaaa atatttggaa aatgatttgc atggaaagcca tggtaaaac 13200
 catgacatcc acttggagga tgcaataatg aagaaaaacta caaatttaca tgcaactatg 13260
 tatgcatttgcgtt gtctatataa tgaggattt gcaatactt cattcataca cactcaata 13320
 gtttacacg attataattt cttcatagcc agcagatctg ccggcatcga tccccggcca 13380
 tggccgttgcattt taatgagata tgccgatgcgctt atgatatttgc ttctcaattt 13440
 tggtgcac gttgtaaaaa acctgagcat gtgttagctca gatcatttacc gccgggttcg 13500
 gttcattctta atgaatataat caccgttac tattgttattt ttatgatataa tattctcgat 13560
 tcaatttactt gattgtccgtt cgacgagctc ggccgcgcctc tagaggatcg atgaatttgc 13620
 atccgcgttgcgg tggcttccttcc aacgttgcgg ttctgtcagt tccaaacgtt aaacggctt 13680
 tccccgtca tcggcgggggg tcataacgtt acctccctaa ttctccgtc atgatcagat 13740
 tgtcgtttcc cgccttcagt ttaaaactatc agtgtttgac aggatattt ggcgggtaaa 13800
 cctaagagaa aagagcggtt attagaataa tcggatattt aaaaggcggtt gaaaagggtt 13860
 atccttcgtc catttgcatttgcgtt tgcatgccaa ccacagggtt cccca 13905

<210> 69

<211> 1443

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>

<221> CDS

<222> (9) .. (1442)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 69

gatctaaa atg ggc aaa gga ggg gac gct cgg gcc tcg aag ggc tca acg Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr 1 5 10	50
gcg gct cgc aag atc agt tgg cag gaa gtc aag acc cac gcg tct ccg Ala Ala Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro 15 20 25 30	98
gag gac gcc tgg atc att cac tcc aat aag gtc tac gac gtg tcc aac Glu Asp Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn 35 40 45	146
tgg cac gaa cat ccc gga ggc gcc gtc att ttc acg cac gac ggt gac Trp His Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp 50 55 60	194

106

gac atg acg gac att ttc gct gcc ttt cac gca ccc gga tcg cag tcg	242
Asp Met Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser	
65 70 75	
ctc atg aag aag ttc tac att ggc gaa ttg ctc ccg gaa acc acc ggc	290
Leu Met Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly	
80 85 90	
aag gag ccg cag caa atc gcc ttt gaa aag ggc tac ccg gat ctg cgc	338
Lys Glu Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg	
95 100 105 110	
tcc aaa ctc atc atg atg ggc atg ttc aag tcc aac aag tgg ttc tac	386
Ser Lys Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr	
115 120 125	
gtc tac aag tgc ctc agc aac atg gcc att tgg gcc gcc tgt gct	434
Val Tyr Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Cys Ala	
130 135 140	
ctc gtc ttt tac tcg gac cgc ttc tgg gta cac ctg gcc agc gcc gtc	482
Leu Val Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val	
145 150 155	
atg ctg gga aca ttc ttt cag cag tcg gga tgg ttg gca cac gac ttt	530
Met Leu Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe	
160 165 170	
ctg cac cac cag gtc ttc acc aag cgc aag cac ggg gat ctc gga gga	578
Leu His His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Gly	
175 180 185 190	
ctc ttt tgg ggg aac ctc atg cag ggt tac tcc gta cag tgg tgg aaa	626
Leu Phe Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys	
195 200 205	
aac aag cac aac gga cac cac gcc gtc ccc aac ctc cac tgc tcc tcc	674
Asn Lys His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser	
210 215 220	
gca gtc gcg caa gat ggg gac cgc gac atc gat acc atg ccc ctt ctc	722
Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu	
225 230 235	
gcc tgg tcc gtc cag caa gcc cag tct tac cgg gaa ctc caa gcc gac	770
Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp	
240 245 250	
gga aag gat tcg ggt ttg gtc aag ttc atg atc cgt aac caa tcc tac	818
Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr	
255 260 265 270	
ttt tac ttt ccc atc ttg ttg ctc gcc cgc ctg tcg tgg ttg aac gag	866
Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu	
275 280 285	
tcc ttc aag tgc gcc ttt ggg ctt gga gct gcg tcg gag aac gct gct	914
Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala	
290 295 300	
ctc gaa ctc aag gcc aag ggt ctt cag tac ccc ctt ttg gaa aag gct	962
Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala	
305 310 315	
ggc atc ctg ctg cac tac gct tgg atg ctt aca gtt tcg tcc ggc ttt	1010
Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe	
320 325 330	
gga cgc ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta acc gcg acc	1058
Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr	
335 340 345 350	

107

gct tcc tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc ggc cac aac	1106
Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn	
355 360 365	
ggc atg gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc tgg aag ctc	1154
Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu	
370 375 380	
caa gtc acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt ttc ccc caa	1202
Gln Val Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Phe Pro Gln	
385 390 395	
gcc ttt gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa gtc gac cac	1250
Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His	
400 405 410	
cac tta ttc ccc agc ctg ccc cga cac aat ctg gcc aag aca cac gca	1298
His Leu Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala	
415 420 425 430	
ctg gtc gaa tcg ttc tgc aag gag tgg ggt gtc cag tac cac gaa gcc	1346
Leu Val Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala	
435 440 445	
gac ctt gtg gac ggg acc atg gaa gtc ttg cac cat ttg ggc agc gtg	1394
Asp Leu Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val	
450 455 460	
gcc ggc gaa ttc gtc gtg gat ttt gta cgc gat gga ccc gcc atg taa a	1443
Ala Gly Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met	
465 470 475	

<210> 70

<211> 477

<212> PRT

<213> Phaeodactylum tricor nutum

<400> 70

Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala	
1 5 10 15	
Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp	
20 25 30	
Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His	
35 40 45	
Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met	
50 55 60	
Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met	
65 70 75 80	
Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu	
85 90 95	
Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys	
100 105 110	
Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr	
115 120 125	
Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Cys Ala Leu Val	
130 135 140	
Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu	
145 150 155 160	
Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His	

108

165	170	175	
His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His	Gly Asp Leu Gly	Gly Leu Phe	
180	185	190	
Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp	Trp Lys Asn Lys		
195	200	205	
His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His	Cys Ser Ser Ala Val		
210	215	220	
Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro	Leu Leu Ala Trp		
225	230	235	240
Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala	Asp Gly Lys		
245	250	255	
Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser	Tyr Phe Tyr		
260	265	270	
Phe Pro Ile Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser	Phe		
275	280	285	
Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala	Leu Glu		
290	295	300	
Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala	Gly Ile		
305	310	315	320
Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe	Gly Arg		
325	330	335	
Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr	Ala Ser		
340	345	350	
Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn	Gly Met		
355	360	365	
Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu	Gln Val		
370	375	380	
Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro	Gln Ala Phe		
385	390	395	400
Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His	His Leu		
405	410	415	
Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala	Leu Val		
420	425	430	
Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala	Asp Leu		
435	440	445	
Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val	Ala Gly		
450	455	460	
Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met			
465	470	475	

<210> 71

<211> 17061

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*, *Physcomitrella patens*, *Caenorhabditis elegans*

<220>

<221> CDS

<222> (4554)..(5987)

<223> *Phaeodactylum tricornutum* Delta-6-Desaturase

109

<220>
 <221> CDS
 <222> (2805)..(3653)
 <223> *Caenorhabditis elegans* LPLAT

<220>
 <221> CDS
 <222> (1026)..(1898)
 <223> *Physcomitrella patens* Delta-6-Elongase

<400> 71

tggggAACCC	tgtggTTggc	atgcacatac	aaatggacgA	aggataaaacc	ttttcacGCC	60
cttttaaATA	tccgattatt	ctaataaaACG	ctttttCTC	ttaggtttac	ccgccaatAT	120
atccTGTcaa	acactgatAG	tttaaactGA	aggcgggAAA	cgacaatCTG	atcatgagCG	180
gagaattaAG	ggagTCACGT	tatgacCCC	gcccgtgACG	cgggacaAGC	cgttttacGT	240
ttggaaACTGA	cagaaccGCA	acgttGAAGG	agccactCAG	ccgatCTGAA	ttcatcgATC	300
ctctagAGGC	gcGCCGAGCT	cctcgAGCAA	atttacACAT	tgccactAAA	cgtctaaACC	360
cttGtaATTt	gttttGTTT	tactatGTGT	gttatgtATT	tgatttgcGA	taaattttTA	420
tatTTGtaC	taaattttATA	acaccTTTA	tgctAACGTT	tgccAAcACT	tagcaATTG	480
caagttGATT	aattgattCT	aaattatTTT	tgtcttCTAA	atacatatac	taatcaACTG	540
gaaatGtaAA	tatTTGCTAA	tatttCTACT	ataggAGAAAT	taaagtGAGT	gaatatGGTA	600
ccacaAGGTT	tggagATTtA	attttGtGAA	tgctgcATGG	atggcatATA	caccaaACAT	660
tcaataATTc	ttgaggATAA	taatGGTACc	acacaAGATT	tgaggtGcat	gaacgtcacG	720
tggacAAAG	gttttagtaAT	ttttcaAGAC	aacaatGTTA	ccacacACAA	gttttgAGGt	780
gcatGcatGG	atGCCCTGTG	gaaagtTTAA	aaatattttG	gaaatGATTt	gcatggAAc	840
catGtGtaAA	accatGACAT	ccacttGGAG	gatGcaATAA	tgaagAAAAC	tacaaatttTA	900
catGcaACTA	gttatGcatG	tagtctATAT	aatGAGGATT	ttGcaAAact	ttcattcATA	960
cacactCACT	aagtTTACA	cgattataAT	ttcttcATAG	ccagcccACC	gcggTgggCG	1020
gccgc ATG	atG GAG GTC	gtG GAG AGA	ttc tac GGT	gat GGG AAG	gtc Lys Val	1070
Met Glu Val	Val Glu Arg	Phe Tyr Gly	Glu Leu Asp	Gly Lys Val		
1	5	10	15			
tcg cag ggc	gtg aat gca	ttg ctg	ggt agt ttt	ggg gtg	gag ttg acg	1118
Ser Gln Gly	Val Asn Ala	Leu Leu Gly	Ser Phe Gly	Val Glu Leu	Thr	
20	25	30				
gat acg ccc	act acc aaa	ggc ttg ccc	ctc gtt	gac agt ccc	aca ccc	1166
Asp Thr Pro	Thr Thr Lys	Gly Leu Pro	Leu Val Asp	Ser Pro	Thr Pro	
35	40	45				
atc gtc ctc	ggt gtt tct	gta tac ttG	act att gtc	att gga	ggg ctt	1214
Ile Val Leu	Gly Val Ser	Val Tyr Leu	Thr Ile Val	Ile Gly	Gly Leu	
50	55	60				
ttg tgg ata	aag gcc agg	gat ctg aaa	ccg cgc	gcc tcg	gag cca ttt	1262
Leu Trp Ile	Lys Ala Arg	Asp Leu Lys	Pro Arg Ala	Ser Glu Pro	Phe	
65	70	75				
ttg ctc caa	gct ttG	gtg ctt	gtG cac	aac ctG	ttc tGt	1310
Leu Leu Gln	Ala Leu Val	Leu Val His	Asn Leu Phe	Cys Phe	Ala Leu	
80	85	90				
agt ctG tat	atG tGc	gtG ggc	atc gct	tat cag	gct att acc	1358
Ser Leu Tyr	Met Cys Val	Gly Ile Ala	Tyr Gln Ala	Ile Thr	Trp Arg	
100	105	110				
tac tct ctc	tgg ggc	aat gca	tac aat	cct aaa	cat aaa	1406
Tyr Ser Leu	Trp Gly Asn	Ala Tyr Asn	Pro Lys	His Lys	Glu Met Ala	
115	120	125				
att ctG gta	tac ttG	ttc tac	atG tct	aag tac	gtG gaa ttc	1454

110

Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp
 130 135 140
 acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg caa ata agc ttc ctc 1502
 Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu
 145 150 155
 cac gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att tgg tgg gct att gct 1550
 His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala
 160 165 170 175
 cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct gcg gct ctg aac tca 1598
 His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser
 180 185 190
 gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc ttg gct gcc tgc ctt 1646
 Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu
 195 200 205
 cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt ttt tgg ggc agg tac 1694
 Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr
 210 215 220
 ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg aac tta gtg cag gct 1742
 Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala
 225 230 235
 tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag 1790
 Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys
 240 245 250 255
 att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt 1838
 Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe
 260 265 270
 tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct 1886
 Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala
 275 280 285
 aaa act gag tga tctagaaggc ctacctgcttt aatgagatat gcgagacgcc 1938
 Lys Thr Glu
 290
 tatgatcgca tgatatttgc tttcaattctt gttgtgcacg ttgtaaaaaaaaa cctgagcatg 1998
 ttagctcg atccattaccc cccggtttcggtt ttcattctaa tgaatataatc acccgttact 2058
 atcgtatattt tatgaataat attctccgtt caatttactg attgtccgtc gagcaaattt 2118
 acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taattttgttt ttgttttact atgtgtgtta 2178
 tgtatttgat ttgcgataaa tttttatattt tggactaaa ttataaacac cttttatgt 2238
 aacgtttgc aacacttagc aatttgcag ttgattaattt gattctaaat tattttgtc 2298
 ttctaaatac atataactaat caactggaaa tgtaaatattt tgctaatattt tctactata 2358
 gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aagggttggg gatttaattt ttgcaatgt 2418
 gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttgc ggataataat ggtaccacac 2478
 aagatttgag gtgcgtgaaac gtcacgtggca caaaagggtt agtaattttt caagacaaca 2538
 atgttaccac acacaaggaaat tgaggtgc gcatggatgc cctgtggaaa gttttttttttt 2598
 attttggaaa tgatatttgc ggaaggccatg tgtaaaaccat tgacatccac ttggaggatg 2658
 caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagttt tgcatgttagt ctatataatg 2718
 aggattttgc aatactttca ttccatatacaca ctcactaagt ttacacgtatataatttctt 2778
 tcatagccag cggatccgccc cacata atg gag aac ttc tgg tct att gtt gtg 2831
 Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val
 295
 ttt ttt cta ctc tca att ctc ttc att tta tat aac ata tcg aca gta 2879
 Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val
 300 305 310 315
 tgc cac tac tat atg cgg att tcg ttt tat tac ttc aca att tta ttg 2927
 Cys His Tyr Tyr Met Arg Ile Ser Phe Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu

111

320	325	330	
cat gga atg gaa gtt tgt gtt aca atg atc cct tct tgg cta aat ggg His Gly Met Glu Val Cys Val Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly			2975
335	340	345	
aag ggt gct gat tac gtg ttt cac tcg ttt ttc tat tgg tgt aaa tgg Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp			3023
350	355	360	
act ggt gtt cat aca aca gtc tat gga tat gaa aaa aca caa gtt gaa Thr Gly Val His Thr Val Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu			3071
365	370	375	
ggt ccg gct gta gtt att tgt aat cat cag agt tct ctc gac att cta Gly Pro Ala Val Val Ile Cys Asn His Gln Ser Ser Leu Asp Ile Leu			3119
380	385	390	395
tcg atg gca tca atc tgg ccg aag aat tgt gtt gta atg atg aaa cga Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg			3167
400	405	410	
att ctt gcc tat gtt cca ttc ttc aat ctc gga gcc tac ttt tcc aac Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn			3215
415	420	425	
aca atc ttc atc gat cga tat aac cgt gaa cgt gcg atg gct tca gtt Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val			3263
430	435	440	
gat tat tgt gca tct gaa atg aag aac aga aat ctt aaa ctt tgg gta Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val			3311
445	450	455	
ttt ccg gaa gga aca aga aat cgt gaa gga ggg ttc att cca ttc aag Phe Pro Glu Gly Thr Arg Asn Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys			3359
460	465	470	475
aaa gga gca ttc aat att gca gtt cgt gcg cag att ccc att att cca Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro			3407
480	485	490	
gtt gta ttc tca gac tat cgg gat ttc tac tca aag cca ggc cga tat Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr			3455
495	500	505	
ttc aag aat gat gga gaa gtt gtt att cga gtt ctg gat gcg att cca Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro			3503
510	515	520	
aca aaa ggg ctc act ctt gat gac gtc agc gag ttg tct gat atg tgt Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys			3551
525	530	535	
cgg gac gtt atg ttg gca gcc tat aag gaa gtt act cta gaa gct cag Arg Asp Val Met Leu Ala Ala Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln			3599
540	545	550	555
caa cga aat gcg aca cgg cgt gga gaa aca aaa gac ggg aag aaa tct Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser			3647
560	565	570	
gag taa gctagcgtta accctgcttt aatgagatat gcgagacgcc tatgatcgca Glu			3703
tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaaaa cctgagcatg ttagctcag atccttaccg ccggtttccgg ttcattctaa tgaatatac acccgttact atcgatattt			3763
tatgaataat attctccgtt caatttactg attgtccgtc gagcaaattt acacattgcc			3823
actaaacgtc taaacccttg taatttgc ttgtttact atgtgtgtta tttatgtat ttgcgataaaa ttttatatt tggactaaa ttataacac ctttatgct aacgtttgcc			3883
			3943
			4003

aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt gattctaaat tattttgtc ttctaaatac	4063
ataactaat caactggaaa tggaaatatt tgctaatatt tctactatag gagaattaaa	4123
gtgagtgaat atggtaccac aagggttggg gatttaattt ttgcaatgt gcatggatgg	4183
catatacacc aaacattcaa taattcttga ggataataat ggtaccacac aagattttag	4243
gtgcacgtgaa gtcacgtgga caaaaagggtt agtaattttt caagacaaca atgttaccac	4303
acacaagttt tgaggtgcat gcatggatgc cctgtggaaa gttaaaaat attttggaaa	4363
tgatttgcat ggaagccatg tgtaaaaacca tgacatccac ttggaggatg caataatgaa	4423
aaaaactaca aatttacatg caactagtta tgcatgtagt ctatataatg aggattttgc	4483
aatacttca ttcatacaca ctcactaagt ttacacatg tataatttct tcataagccag	4543
cagatctaaa atg ggc aaa gga ggg gac gct cgg gcc tcg aag ggc tca	4592
Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser	
575 580 585	
acg gcg gct cgc aag atc agt tgg cag gaa gtc aag acc cac gcg tct	4640
Thr Ala Ala Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser	
590 595 600	
ccg gag gac gcc tgg atc att cac tcc aat aag gtc tac gac gtg tcc	4688
Pro Glu Asp Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser	
605 610 615	
aac tgg cac gaa cat ccc gga ggc gcc gtc att ttc acg cac gcc ggt	4736
Asn Trp His Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly	
620 625 630	
gac gac atg acg gac att ttc gct gcc ttt cac gca ccc gga tcg cag	4784
Asp Asp Met Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln	
635 640 645	
tcg ctc atg aag aag ttc tac att ggc gaa ttg ctc ccg gaa acc acc	4832
Ser Leu Met Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr	
650 655 660 665	
ggc aag gag ccg cag caa atc gcc ttt gaa aag ggc tac cgc gat ctg	4880
Gly Lys Glu Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu	
670 675 680	
cgc tcc aaa ctc atc atg atg ggc atg ttc aag tcc aac aag tgg ttc	4928
Arg Ser Lys Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe	
685 690 695	
tac gtc tac aag tgc ctc agc aac atg gcc att tgg gcc gcc gcc tgt	4976
Tyr Val Tyr Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys	
700 705 710	
gct ctc gtc ttt tac tcg gac cgc ttc tgg gta cac ctg gcc agc gcc	5024
Ala Leu Val Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala	
715 720 725	
gtc atg ctg gga aca ttc ttt cag cag tcg gga tgg ttg gca cac gac	5072
Val Met Leu Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp	
730 735 740 745	
ttt ctg cac cac cag gtc ttc acc aag cgc aag cac ggg gat ctc gga	5120
Phe Leu His His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly	
750 755 760	
gga ctc ttt tgg ggg aac ctc atg cag ggt tac tcc gta cag tgg tgg	5168
Gly Leu Phe Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp	
765 770 775	
aaa aac aag cac aac gga cac cac gcc gtc ccc aac ctc cac tgc tcc	5216
Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser	
780 785 790	
tcc gca gtc gcg caa gat ggg gac ccg gac atc gat acc atg ccc ctt	5264
Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu	
795 800 805	

113

ctc gcc tgg tcc gtc cag caa gcc cag tct tac cgg gaa ctc caa gcc	5312
Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala	
810 815 820 825	
gac gga aag gat tcg ggt ttg gtc aag ttc atg atc cgt aac caa tcc	5360
Asp Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser	
830 835 840	
tac ttt tac ttt ccc atc ttg ttg ctc gcc cgc ctg tcg tgg ttg aac	5408
Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn	
845 850 855	
gag tcc ttc aag tgc gcc ttt ggg ctt gga gct gcg tcg gag aac gct	5456
Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala	
860 865 870	
gct ctc gaa ctc aag gcc aag ggt ctt cag tac ccc ctt ttg gaa aag	5504
Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys	
875 880 885	
gct ggc atc ctg ctg cac tac gct tgg atg ctt aca gtt tcg tcc ggc	5552
Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly	
890 895 900 905	
ttt gga cgc ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta acc gcg	5600
Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala	
910 915 920	
acc gcg tcc tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc ggc cac	5648
Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His	
925 930 935	
aac ggc atg gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc tgg aag	5696
Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys	
940 945 950	
ctc caa gtc acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt ttc ccc	5744
Leu Gln Val Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro	
955 960 965	
caa gcc ttt gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa gtc gac	5792
Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp	
970 975 980 985	
cac cac tta ttc ccc agc ctg ccc cga cac aat ctg gcc aag aca cac	5840
His His Leu Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His	
990 995 1000	
gca ctg gtc gaa tcg ttc tgc aag gag tgg ggt gtc cag tac cac	5885
Ala Leu Val Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His	
1005 1010 1015	
gaa gcc gac ctt gtg gac ggg acc atg gaa gtc ttg cac cat ttg	5930
Glu Ala Asp Leu Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu	
1020 1025 1030	
ggc agc gtg gcc ggc gaa ttc gtc gtg gat ttt gta cgc gat gga	5975
Gly Ser Val Ala Gly Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly	
1035 1040 1045	
ccc gcc atg taa agatctgccg gcatcgatcc cggccatgg cctgctttaa	6027
Pro Ala Met	
 tgagatatgc gagacgccta tgatcgcatg atattgctt tcaattctgt tggcacgtt	6087
gtaaaaaac tgagcatgtg tagctcagat ccttaccgccc ggtttcgggtt cattctaattg	6147
aatatatcac ccgttactat cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat	6207
tgtccgtcga cgagctcggc gcgcgcgtcga cctgcaggca tgcaagcttc acgctgccgc	6267
aagcactcag ggcgcaaggg ctgctaaagg aagcggaaaca cgtagaaaagc cagtccgcag	6327
aaacggtgct gaccccgat gaatgtcagc tactggctta tctggacaag ggaaaacgca	6387

agcgcggaa	gaaaggcaggt	agcttgcagt	gggcttacat	ggcgatagct	agactggcg	6447
gttttatgga	cagcaagcga	accggaattt	ccagctgggg	cgcctctgg	taagggttggg	6507
aagccctgca	aagtaaactg	gatggcttc	ttggcgc当地	ggatctgatg	gcmcagggga	6567
tcaagatcat	gagcggagaa	ttaaggaggt	cacgttatga	ccccgc当地	tgacgc当地	6627
caagccgtt	tacgtttgga	actgacagaa	ccgcaacgtt	gaaggagcca	ctcagcccg	6687
gttcttgga	gtttaatgag	ctaagcacat	acgtcagaaa	ccattattgc	gcgttcaaaa	6747
gtccctctaag	gtcactatca	gctagcaa	atttcttgc	aaaaatgctc	cactgacgtt	6807
ccataaattt	ccctcggtat	ccaatttagag	tctcatattc	actctcaatc	cagatctcga	6867
ctctagtcga	gggccc当地	gagcttggat	tgaacaagat	ggattgc当地	cagggttctcc	6927
ggccgcttgg	gtggagagc	tattcggcta	tgactggca	caacagacaa	tcggctgctc	6987
tgtatccgccc	gtgttccggc	tgtcagc当地	ggggc当地	gttcttttgc	tcaagacg	7047
cctgtccgg	gccctgaatg	aactgc当地	cgaggc当地	cggctatcgt	ggctggccac	7107
gacggcg	c当地	ctgtgc当地	cgttgc当地	gaagc当地	gggactg	7167
gctattggc	gaagtgc当地	ggcaggatct	cctgtc当地	cacccgctc	ctgccc当地	7227
agtatccatc	atggctgatg	caatgc当地	gctgc当地	cttgatccgg	ctacctgccc	7287
attcgaccac	caagc当地	atcgcatcga	gcgagc当地	actcgatgg	aagccgg	7347
tgtcgatcag	gatgatctgg	acgaagagca	tcagggc当地	gccc当地	aactgttgc	7407
caggctcaag	gc当地	ccgac当地	ggatctc当地	gtgacccatg	gcatgc当地	7467
cttgc当地	aatcatgg	aaaatggccg	cttttctgga	ttcatgc当地	gtggcc当地	7527
gggtgtggcg	gaccgctatc	aggacatagc	gttggctacc	cgtgatattg	ctgaagagc	7587
tggc当地	ttggctgacc	gcttcc	gttta	atcggc当地	ccgattc当地	7647
gccc当地	ttctatc当地	ttcttgc当地	gttcttctg	gccc当地	agctagctc	7707
gacggatccc	ccgatgagct	aagctagcta	tatcatcaat	ttatgttata	cacataat	7767
cgcactc	acttcatcta	cgcaatgta	ccagctgata	taatcagtt	ttgaaatatt	7827
tctgaattt	aacttgc当地	aataaattt	tggttgc当地	tggactataa	tacctgactt	7887
gttatttt	caataaataat	ttaaactata	tttcttcaa	gatggaa	aattcactgg	7947
ccgtcg	tttt	acaacgtcgt	gactggaaa	accctggcgt	taccaactt	8007
cagcacatcc	cccttgc当地	agctggc当地	atagc当地	ggccc当地	gatgc当地	8067
cccaacagtt	gccc当地	aatggc当地	gctc当地	cttcttccc	ttccttctc	8127
gccacgtt	ccggcttcc	ccgtcaagct	ctaaatc当地	ggctccctt	agggttccg	8187
tttagtgctt	tacggcacct	cgacccaaa	aaacttgatt	tggtgatgg	ttcacgt	8247
gggc当地	cctgatagac	ggtttc当地	ccttgc当地	tggagtc当地	ttttaat	8307
agtggactct	tgttccaaac	tggaaacaaca	ctcaacccta	tctc当地	ttcttttgc当地	8367
ttataaggga	tttgccgat	ttcggaaacca	ccatcaaaca	ggatttgc	ctgctggg	8427
aaaccagcgt	ggaccgctt	ctgcaactct	ctcagg	ggc当地	ggcaatc	8487
tgttccc当地	ctca	actgg	aaaagaaaaa	ccaccc	actt	8547
gtgttattaa	gttgc当地	cgtaattt	tttgc当地	tgaa	acacgg	8607
agccacacgc	tccccgacc	gcagctc当地	acaaaatc	actc	gccc当地	8667
tcagtc当地	acggcgtc	c当地	ggc当地	ggc当地	actt	8727
ccgatgtat	tccgaa	ggcaacta	ctgccc当地	tgaa	acacgg	8787
ggagggtagc	atgttgc当地	tttgc当地	tgcc	atgtatc	tc当地	8847
ctccctcgca	gagatccgaa	ttatc	tttatttcat	ttc	tc当地	8907
gctgtcgatc	ttgagaacta	tgccgacata	ataggaa	accgt	gacag	8967
aagctgactg	gc当地	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9027
tgctc当地	atgg	tgatg	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9087
cggtc当地	acccc	gatc	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9147
gagtgc当地	atcccc	gg	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9207
ccacgc当地	ccgaga	acat	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9267
agctactg	acgagc	agaa	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9327
aggcacgg	ggttgc	actt	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9387
cgccagg	gctgc当地	gacgc	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9447
cgccacgc	gcagttcc	cc	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9507
tagcagagc	gcagagat	acacg	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9567
gacccgccc	ggcaggcg	gg	tttgc当地	tttgc当地	tttgc当地	9627

aagtgcgcgg	aggatgaaga	tgcgcaccca	ccagattccc	gttggaatct	gtcggacgat	9687
catcacgagc	aataaaacccg	ccggcaacgc	ccgcagcagc	ataccggcga	cccctcgccc	9747
tcgcgttgc	ggctccacga	aaacgcccga	cagatgcgcc	tttgagcggt	ccttggggcc	9807
gtcctcctgt	ttgaagaccc	acagccaaat	gatctcgccg	tcgatgtagg	cgccgaatgc	9867
cacggcatct	cgcaaccgtt	cagcgaacgc	ctccatgggc	tttttctcct	cgtgctcgta	9927
aacggacccg	aacatctctg	gagctttctt	cagggccgac	aatcgatct	cgcggaaatc	9987
ctgcacgtcg	gccgctccaa	gccgtcgaat	ctgagcctta	atcacaattt	tcaattttaa	10047
tcctctgttt	atcggcagtt	cgtagagcgc	gccgtgcgtc	ccgagcgata	ctgagcgaag	10107
caagtgcgtc	gaggcgtgcc	cgctgttcc	tgaaatggca	gtaaagcgct	ggctgctgaa	10167
cccccagccg	gaactgaccc	cacaaggccc	tagcgtttgc	aatgcaccag	gtcatcattt	10227
acccaggcgt	gttccaccag	gccgctgcct	cgcaactctt	cgcaggcttc	gccgacactgc	10287
tcgcccact	tcttcacgcg	ggtgaaatcc	gatccgcaca	tgaggcggaa	ggtttccagc	10347
ttgagcgggt	acggctcccg	gtgcgagctg	aaatagtca	acatccgtcg	ggccgtcgcc	10407
gacagcttgc	gttacttctc	ccatatgaat	ttcgtgttagt	ggtgcgcagc	aaacagcactg	10467
acgatttact	cgtcgatcg	gacctggcaa	cgggacgtt	tcttgcacag	gtccaggacg	10527
cggaaagcgtt	gcagcagcga	caccgattcc	aggtgccccaa	cgcgtcgga	cgtgaagccc	10587
atcgccgtcg	cctgttaggcg	cgacaggcat	tcctcgccct	tcgtgtataa	ccggccattt	10647
atcgaccagc	ccaggtcctg	gcaaagctcg	tagaacgtga	aggtgatcgg	ctcgccgata	10707
ggggtgcgt	tcgcgtactc	caacacctgc	tgccacacca	gttcgtcatc	gtcggccccc	10767
agctcgacgc	cggtgttaggt	gatcttcacg	tccttggta	cgtggaaaat	gaccttggtt	10827
tgcagcgct	cgcgccggat	tttcttggta	cgcgtggta	acagggcaga	gcggggccgtg	10887
tcgtttggca	tcgctcgcat	cgtgtccggc	cacggcgccaa	tatcaacaa	ggaaagctgc	10947
atttccttga	tctgctgctt	cgtgttttc	agcaacgcgg	cctgcttggc	ctcgctgacc	11007
tgttttgcga	ggtcttcgccc	ggcggttttt	cgcttcttgg	tcgtcataagt	tcctcgctg	11067
tcgatggta	tcgacttcgc	caaacctgcc	gcctcctgtt	cgagacgacg	cgaacgctcc	11127
acggccggccg	atggcgcggg	cagggcaggg	ggagccagg	gcacgctg	gcgctcgatc	11187
ttggccgttag	cttgctggac	catcgagccg	acggacttgg	aggttgcg	gggcgcacgc	11247
atgacgggtgc	ggcttgcgat	ggtttggca	tcctcggcgg	aaaacccccc	gtcgatca	11307
tcttgcctgt	atgccttccg	gtcaaacgtc	cgattcattt	accctcctt	cgggattgcc	11367
ccgactcact	ccggggcaat	gtgcccatt	tcctgattt	acccgcctt	tgcccttgg	11427
tccagataat	ccaccttatac	ggcaatgaag	tcggtcccgt	agaccgtctg	gccgtccctc	11487
tcgtacttgg	tattccgaat	cttgccctgc	acgaataacca	gcgacccctt	gccccaaatac	11547
ttgcccgtgg	cctcggcctg	agagcaaaa	cacttgatgc	ggaagaagtc	ggtgcgttcc	11607
tgcttgcgc	cgcacatcg	gcccacatc	taggtactaa	aacaattcat	ccagtaaaat	11667
ataatatttt	atttctccc	aatcaggctt	gatccccagt	aagtcaaaaa	atagctcgac	11727
atactgttct	tccccgat	cctccctgt	cgacggacg	cagaaggcaa	tgtcatacc	11787
cttgcgcgc	ctgccccttc	tcccaagatc	aataaagcca	cttacttgc	catcttcac	11847
aaagatgtt	ctgtctccca	ggtcggcgt	ggaaaagaca	agttctt	cggttttttc	11907
cgtctttaaa	aaatcataca	gctcgcgcgg	atctttaat	ggagtgtt	cttccctagg	11967
ttcgcataatcc	acatcgccca	gatcg	tatcgat	tccaaatccg	ctaagcggct	12027
gtctaagacta	ttcgatagg	gacaatccga	tatgtcgat	gagtggaaaga	gcctgatgca	12087
ctccgcatac	agctcgataa	tctttcagg	gctttgttca	tcttcataact	cttccgagca	12147
aaggacgcca	tcggcctcac	tcatgacg	attgtccag	ccatcatg	gttcaaagt	12207
caggacccctt	gaaacaggca	gtttccctc	cagccatagc	atcatgtct	tttcccttgc	12267
cacatcatag	gtggccctt	tataccggct	gtccgtcatt	tttaaatata	ggtttttatt	12327
ttctccacc	agtttatata	ccttagcagg	agacatttct	tccgtatctt	ttacgcagcg	12387
gtattttcg	atcagttttt	tcaattccgg	tgatattctc	attttagcca	tttatttattt	12447
ccttccttctt	ttctacagta	tttaagata	ccccaaagaag	ctaattataa	caagacgaac	12507
tccaattcac	tgtccctgc	attctaaaac	cttaaaatacc	agaaaacagc	tttttcaaag	12567
ttgttttcaa	agttggcgta	taacatagta	tcgacggagc	cgattttgaa	accacaatta	12627
tgggtatgc	tgcacttta	ctgat	ttgtatgtgt	tttttggagg	tgctccagtg	12687
gcttctgtgt	ctatcagctg	tccctcctgt	tcaagctactg	acgggggtt	gcttaacggc	12747
aaaagcaccg	ccggacatca	gctatctc	tgctctact	gccgtaaaac	atggcaactg	12807
cagttcactt	acaccgcttc	tcaacccgg	acgcaccaga	aaatcattga	tatggccat	12867

aatggcgttg	gatgccgggc	aacagccgc	attatggcg	ttggcctcaa	cacgatttt	12927
cgtcacttaa	aaaactcagg	ccgcagtcgg	taacctcgcg	catacagccg	gcaagtgcacg	12987
tcatcgctg	cgcggaaatg	gacgaacagt	ggggctatgt	cggggctaaa	tcgcgcccagc	13047
gctggctgtt	ttacgcgtat	gacagtctcc	ggaagacggt	tgttgcgcac	gtattcggtg	13107
aacgcactat	ggcgacgctg	gggcgtctta	tgagcctgct	gtcacccctt	gacgtggta	13167
tatggatgac	ggatggctgg	ccgctgtatg	aatcccgctt	gaaggaaag	ctgcacgtaa	13227
tcagcaagcg	atatacgcag	cgaattgagc	ggcataacct	gaatctgagg	cagcacctgg	13287
cacggctggg	acggaagtgc	ctgtcgttct	caaaatcggt	ggagctgcat	gacaaagtca	13347
tcgggcatta	tctgaacata	aaacactatac	aataagttgg	agtcaattacc	caattatgat	13407
agaatttaca	agctataagg	ttattgtcct	ggggttcaag	cattagtcca	tgcaagttt	13467
tatgcttgc	ccattctata	gatataattga	taagcgcgt	gcctatgcct	tgccccctga	13527
aatccttaca	tacggcgata	tcttctatata	aaaagatata	ttatcttatac	agtattgtca	13587
atatattcaa	ggcaatctgc	ctcctcatcc	tcttcatctt	cttcgtcttg	gtagctttt	13647
aaatatggcg	cttcatagag	taattctgta	aagggtccaaat	tctcgttttc	atacctcggt	13707
ataatcttac	ctatcacctc	aaatggttcg	ctgggtttat	cgcacccccc	aacacgagca	13767
cggcaccgc	gaccactatg	ccaagaatgc	ccaaggtaaa	aattgccggc	ccgcggatga	13827
agtccgtgaa	tgccccgacg	gccgaagtga	agggcaggcc	gccacccagg	ccgcccgcct	13887
caactgcccgg	cacctggtcg	ctgaatgtcg	atgccagcac	ctgcgcacg	tcaatgcttc	13947
cgggcgtcgc	gctcggtctg	atcgcccattc	ccgttactgc	cccgatcccc	gcaatggcaa	14007
ggactgccag	cgctgcccatt	tttgggtga	ggccgttcgc	ggccgagggg	cgcagccct	14067
ggggggatgg	gaggcccgcg	ttagcgggccc	gggagggttc	gagaaggggg	ggcacccccc	14127
ttcggcgtgc	gccccgtacgc	gcacaggggcg	cagccctgtt	taaaaacaag	gtttataaaat	14187
attggtttaa	aagcaggtaa	aaagacaggt	tagcggtgcc	cgaaaaacgg	gccccaaacc	14247
ttgcaaaatgc	tggattttct	gcctgtggac	agccctcaa	atgtcaatag	gtgcgcct	14307
catctgtcag	cactctgccc	ctcaagtgtc	aaggatcgcc	ccctctatct	gtcagtagtc	14367
gcgccttca	agtgtcaata	ccgcaggggca	cttataccca	ggcttgcac	catcatctgt	14427
gggaaactcg	cgtaaaatca	ggcggtttcg	ccgatttgcg	aggctggcca	gtccacgtc	14487
gccggccgaa	atcgagcctg	ccctctatct	gtcaacgccc	cgccgggtga	gtcgccccct	14547
caagtgtcaa	cgtccgcccc	tcatctgtca	gtgagggcca	agtttccgc	gaggtatcca	14607
caacgcggc	ggccgcgggt	tctcgcacac	ggcttcgacg	gctttctgg	cgcgtttgc	14667
gggcataaga	cgccgcggag	cccagggcg	agggcaacca	gccccgttag	cgtcgaaag	14727
gctcgccgtc	ttgccttgct	cgtcggtat	gtacttcacc	agtcggcga	agtcgctt	14787
cttgatggag	cgcacggggc	cgtgcttgc	aatcacgcgc	accccccggc	cgttttagcg	14847
gctaaaaaaag	tcatggctct	gcctctgggc	ggaccacgc	catcatgacc	ttgccaagct	14907
cgtccctgtt	ctcttcgatc	ttcgccagca	ggcgaggat	cgtggcatca	ccgaaaccgc	14967
ccgtgcgcgg	gtcgctgggt	agccagagtt	tcagcaggcc	gcccaggccg	cccaaggtcgc	15027
cattgtatgc	ggccagctcg	cgacgtgt	catagtccac	gacgcccgt	attttgtagc	15087
cctggccgac	ggccagcagg	taggcccaca	ggctcatgc	ggcccccggc	gccttttct	15147
caatcgctct	tgcggctgtct	ggaaggcagt	acaccttgat	aggtggctg	cccttcctgg	15207
ttggcttggt	ttcatcagcc	atccgcttgc	cctcatctgt	tacgcggcg	gtagccggcc	15267
agcctcgccag	agcaggattc	ccgttgagca	ccgcccagggt	cgaataaggg	acagtgaaga	15327
aggaacaccc	gctcgccgggt	gggcctactt	cacctatcc	gccccgtga	cgccgttgg	15387
tacaccaagg	aaagtctaca	cgaacccttt	ggcaaaatcc	tgtatatcg	cgaaaaaagg	15447
atggatatac	cgaaaaaaatc	gctataatga	ccccgaagca	gggttatgc	gcggaaaaagc	15507
gccacgcctc	ccgaaggggag	aaaggcggac	agttatccgg	taagcggcag	gtcggaaaca	15567
ggagagcgc	cgagggagct	tccaggggaa	aacgcctgg	atctttatag	tcctgtcg	15627
tttcgcacc	tctgacttgc	gcgtcgat	ttgtgtatgc	cgtcaggggg	gccccggct	15687
tggaaaaacg	ccagcaacgc	ggccctttta	cggttgcgt	cctttgcgt	gccttttgc	15747
cacatgttct	ttccctgcgtt	atccccgtat	tctgtggata	accgtattac	cccttttgc	15807
tgagctgata	ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgc	gcaagtca	gagcggagaa	15867
gcggaaagagc	gccagaaggc	cgccagagag	gcccggcgc	gcccgtgaggc	ttggacgc	15927
gggcaggggc	tgaaaaagcc	cgtacgggc	tgcgtacgggc	gtctgacgc	gtggaaaggg	15987
ggagggatg	ttgtctacat	ggctctgctg	tagtgagtgg	tttgcgc	ggcagcggc	16047
ctgatcaatc	gtcacccttt	ctcggtcctt	caacgttcc	gacaacgc	ctccctttcg	16107

ccaatccatc	gacaatcacc	gcgagtcct	gctcaacgc	tgcgtccgga	ccggcttcgt	16167
cgaaggcgtc	tatcgcggcc	cgcaacagcg	gcgagagcgg	agcctgttca	acgggtccgc	16227
cgcgctcgcc	ggcatcgctg	tcgcccgcct	gctcctcaag	cacggccccca	acagtgaagt	16287
agctgattgt	catcagcgca	ttgacggcgt	ccccggccga	aaaacccgccc	tcgcagagga	16347
agcgaagctg	cgcgtcgcc	gtttccatct	gccccgtcgcc	cggtcgcgtg	ccggcatggaa	16407
tgccgcgcgc	atcgcggtag	gcgagcagcg	cctgcctgaa	gctgcgggca	ttccccatgatca	16467
gaaatgagcg	ccagtcgtcg	tcggctctcg	gcaccgaatg	cgtatgattc	tccgcccagaca	16527
tggcttcggc	cagtgcgtcg	agcagcgcgg	gcttgttcct	gaagtgcgcag	taaagcgcccg	16587
gctgctgaac	ccccaaaccgt	tccgcccagtt	tgcggtgcgt	cagaccgtct	acgcccgcacct	16647
cgttcaacag	gtccaggggcg	gcacggatca	ctgtattcgg	ctgcaacttt	gtcatgcttgc	16707
acactttatac	actgataaaac	ataatatgtc	caccaactta	tcagtgataa	agaatccgcgc	16767
cgttcaatcg	gaccagcgga	ggctggtccg	gaggccagac	gtgaaacccca	acataccccc	16827
gatcgtaatt	ctgagcactg	tcgcgtctga	cgctgtcggc	atcggcctga	ttatgcccgt	16887
gctgcccggc	ctcctgcgcg	atctggttca	ctcgaacgcac	gtcaccgcgg	actatggcat	16947
tctgctggcg	ctgtatgcgt	tggtgcattt	tgccctgcgc	cctgtgtcgg	gcgcgcgtgtc	17007
ggatcggttcc	ggggccggcc	caatcttgct	cgtctcgctg	gccggccca	gatc	17061

<210> 72

<211> 290

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*, *Physcomitrella patens*, *Caenorhabditis elegans*

<400> 72

```

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
1 5 10 15
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
20 25 30
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
35 40 45
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
50 55 60
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
65 70 75 80
Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
85 90 95
Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
100 105 110
Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
115 120 125
Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
130 135 140
Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
145 150 155 160
Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
165 170 175
His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
180 185 190
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
195 200 205
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
210 215 220

```

118

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285
 Thr Glu
 290

<210> 73

<211> 282

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*, *Physcomitrella patens*, *Caenorhabditis elegans*

<400> 73

Met Glu Asn Phe Trp Ser Ile Val Val Phe Phe Leu Leu Ser Ile Leu
 1 5 10 15
 Phe Ile Leu Tyr Asn Ile Ser Thr Val Cys His Tyr Tyr Met Arg Ile
 20 25 30
 Ser Phe Tyr Tyr Phe Thr Ile Leu Leu His Gly Met Glu Val Cys Val
 35 40 45
 Thr Met Ile Pro Ser Trp Leu Asn Gly Lys Gly Ala Asp Tyr Val Phe
 50 55 60
 His Ser Phe Phe Tyr Trp Cys Lys Trp Thr Gly Val His Thr Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Gly Tyr Glu Lys Thr Gln Val Glu Gly Pro Ala Val Val Ile Cys
 85 90 95
 Asn His Gln Ser Ser Leu Asp Ile Leu Ser Met Ala Ser Ile Trp Pro
 100 105 110
 Lys Asn Cys Val Val Met Met Lys Arg Ile Leu Ala Tyr Val Pro Phe
 115 120 125
 Phe Asn Leu Gly Ala Tyr Phe Ser Asn Thr Ile Phe Ile Asp Arg Tyr
 130 135 140
 Asn Arg Glu Arg Ala Met Ala Ser Val Asp Tyr Cys Ala Ser Glu Met
 145 150 155 160
 Lys Asn Arg Asn Leu Lys Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Asn
 165 170 175
 Arg Glu Gly Gly Phe Ile Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe Asn Ile Ala
 180 185 190
 Val Arg Ala Gln Ile Pro Ile Ile Pro Val Val Phe Ser Asp Tyr Arg
 195 200 205
 Asp Phe Tyr Ser Lys Pro Gly Arg Tyr Phe Lys Asn Asp Gly Glu Val
 210 215 220
 Val Ile Arg Val Leu Asp Ala Ile Pro Thr Lys Gly Leu Thr Leu Asp
 225 230 235 240
 Asp Val Ser Glu Leu Ser Asp Met Cys Arg Asp Val Met Leu Ala Ala
 245 250 255
 Tyr Lys Glu Val Thr Leu Glu Ala Gln Gln Arg Asn Ala Thr Arg Arg
 260 265 270

119

Gly Glu Thr Lys Asp Gly Lys Lys Ser Glu
275 280

<210> 74

<211> 477

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*, *Physcomitrella patens*, *Caenorhabditis elegans*

<400> 74

Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala
 1 5 10 15
 Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp
 20 25 30
 Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His
 35 40 45
 Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met
 50 55 60
 Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met
 65 70 75 80
 Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu
 85 90 95
 Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys
 100 105 110
 Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr
 115 120 125
 Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys Ala Leu Val
 130 135 140
 Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu
 145 150 155 160
 Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His
 165 170 175
 His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe
 180 185 190
 Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys Asn Lys
 195 200 205
 His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser Ala Val
 210 215 220
 Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp Gly Lys
 245 250 255
 Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr Phe Tyr
 260 265 270
 Phe Pro Ile Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe
 275 280 285
 Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Glu
 290 295 300
 Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala Gly Ile
 305 310 315 320
 Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe Gly Arg
 325 330 335

120

Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser
340 345 350
Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met
355 360 365
Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val
370 375 380
Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe
385 390 395 400
Val Asp Trp Phe Cys Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu
405 410 415
Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val
420 425 430
Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu
435 440 445
Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly
450 455 460
Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met
465 470 475

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox